



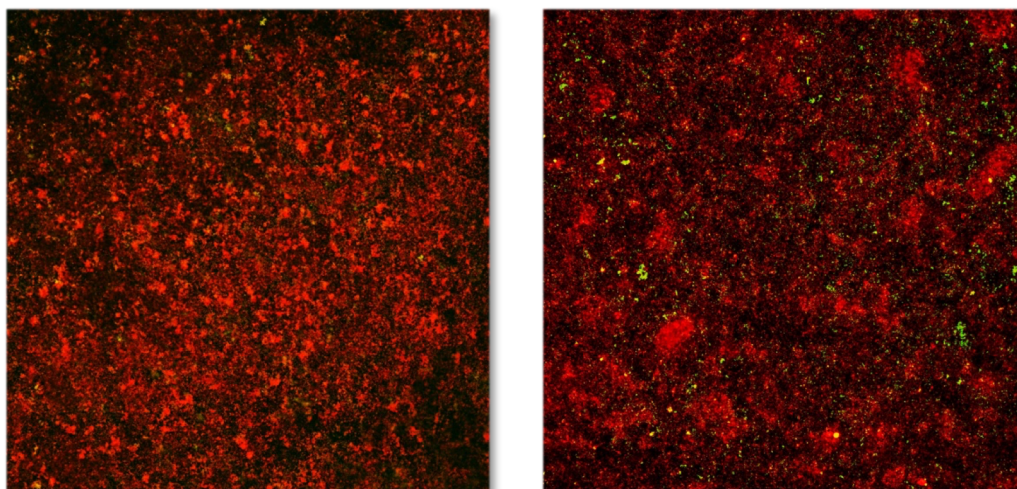
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Odontología

MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Actividad antimicrobiana de ácidos grasos Omega-3
frente a bacterias patógenas orales en un modelo
subgingival multiespecie validado de *biofilm in vitro***



AUTORA: **Andrea Alonso Español**

TUTORA: **Prof.^a Doctora Bettina Alonso Álvarez**

Madrid, curso 2018-2019

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Odontología

MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS



TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Actividad antimicrobiana de ácidos grasos Omega-3
frente a bacterias patógenas orales en un modelo
subgingival multiespecie validado de *biofilm in vitro***

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÁSTER EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS PRESENTADA POR

Andrea Alonso Español

Tutorizada por la Prof.^a Doctora Bettina Alonso Álvarez

Madrid, curso 2018-2019



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Odontología

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

VISTO BUENO DEL TUTOR

MÁSTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

El profesor/a tutor

Nombre y apellidos:	Bettina Alonso Álvarez
---------------------	------------------------

del alumno/a

Nombre y apellidos:	Andrea Alonso Español
---------------------	-----------------------

encuadrado en la línea de investigación

“Eficacia de intervenciones para el tratamiento de las enfermedades periodontales y periimplantarias”

DA EL VISTO BUENO

para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

“Actividad antimicrobiana de ácidos grasos Omega-3 frente a bacterias patógenas orales en un modelo subgingival multiespecie validado de <i>biofilm in vitro</i> ”
--

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En Madrid, a 3 de agosto de 2019.

Fdo: el profesor/a

El presente Visto Bueno se debe acompañar del Trabajo de Investigación en formato electrónico y tres copias en papel



MÁSTER EN: CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

COMPROMISO DEONTOLÓGICO PARA LA ELABORACIÓN, REDACCIÓN Y POSIBLE PUBLICACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER (TFM)

CENTRO: Facultad de Odontología

ESTUDIANTE DE MÁSTER: Andrea Alonso Español

TUTOR/ES DEL TFM: Bettina Alonso Álvarez

TÍTULO DEL TFM: “Actividad antimicrobiana de ácidos grasos Omega-3 frente a bacterias patógenas orales en un modelo subgingival multiespecie validado de *biofilm in vitro*”

FECHA DE PRIMERA MATRÍCULA: 14 de junio de 2018

FECHA DE SEGUNDA MATRÍCULA (en caso de producirse): -

1. Objeto

El presente documento constituye un compromiso entre el estudiante matriculado en el Máster Universitario en Ciencias Odontológicas y su Tutor/es y en el que se fijan las funciones de supervisión del citado trabajo de fin de máster (TFM), los derechos y obligaciones del estudiante y de su/s profesor/es tutor/es del TFM y en donde se especifican el procedimiento de resolución de potenciales conflictos, así como los aspectos relativos a los

derechos de propiedad intelectual o industrial que se puedan generar durante el desarrollo de su TFM.

2. Colaboración mutua

El/los tutor/es del TFM y el autor del mismo, en el ámbito de las funciones que a cada uno corresponden, se comprometen a establecer unas condiciones de colaboración que permitan la realización de este trabajo y, finalmente, su defensa de acuerdo con los procedimientos y los plazos que estén establecidos al respecto en la normativa vigente.

3. Normativa

Los firmantes del presente compromiso declaran conocer la normativa vigente reguladora para la realización y defensa de los TFM y aceptan las disposiciones contenidas en la misma.

4. Obligaciones del estudiante de Máster

- Elaborar, consensuado con el/los Tutor/es del TFM un cronograma detallado de trabajo que abarque el tiempo total de realización del mismo hasta su lectura.
- Informar regularmente al Tutor/es del TFM de la evolución de su trabajo, los problemas que se le planteen durante su desarrollo y los resultados obtenidos.
- Seguir las indicaciones que, sobre la realización y seguimiento de las actividades formativas y la labor de investigación, le hagan su tutor/es del TFM.
- Velar por el correcto uso de las instalaciones y materiales que se le faciliten por parte de la Universidad Complutense con el objeto de llevar a cabo su actividad de trabajo, estudio e investigación.

5. Obligaciones del tutor/es del TFM

- Supervisar las actividades formativas que desarrolle el estudiante; así como desempeñar todas las funciones que le sean propias, desde el momento de la aceptación de la tutorización hasta su defensa pública.
- Facilitar al estudiante la orientación y el asesoramiento que necesite.

6. Buenas prácticas

El estudiante y el tutor/es del TFM se comprometen a seguir, en todo momento, prácticas de trabajo seguras, conforme a la legislación actual, incluida la adopción de medidas necesarias en materia de salud, seguridad y prevención de riesgos laborales.

También se comprometen a evitar la copia total o parcial no autorizada de una obra ajena presentándola como propia tanto en el TFM como en las obras o los documentos literarios, científicos o artísticos que se generen como resultado del mismo. Para tal, el estudiante firmará la Declaración de No Plagio del ANEXO I, que será incluido como primera página de su TFM.

7. Procedimiento de resolución de conflictos académicos

En el caso de producirse algún conflicto derivado del incumplimiento de alguno de los extremos a los que se extiende el presente compromiso a lo largo del desarrollo de su TFM, incluyéndose la posibilidad de modificación del nombramiento del tutor/es, la coordinación del máster buscará una solución consensuada que pueda ser aceptada por las partes en conflicto. En ningún caso el estudiante podrá cambiar de Tutor directamente sin informar a su antiguo Tutor y sin solicitarlo oficialmente a la Coordinación del Máster.

En el caso de que el conflicto persista se gestionará según lo previsto en el SGIC de la memoria verificada.

8. Confidencialidad

El estudiante que desarrolla un TFM dentro de un Grupo de Investigación de la Universidad Complutense, o en una investigación propia del Tutor, que tenga ya una trayectoria demostrada, o utilizando datos de una empresa/organismo o entidad ajenos a la Universidad Complutense de Madrid, se compromete a mantener en secreto todos los datos e informaciones de carácter confidencial que el Tutor/es del TFM o de cualquier otro miembro del equipo investigador en que esté integrado le proporcionen así como a emplear la información obtenida, exclusivamente, en la realización de su TFM.

Asimismo, el estudiante no revelará ni transferirá a terceros, ni siquiera en los casos de cambio en la tutela del TFM, información del trabajo, ni materiales producto de la investigación, propia o del grupo, en que haya participado sin haber obtenido, de forma expresa y por escrito, la autorización correspondiente del anterior Tutor del TFM.

9. Propiedad intelectual e industrial

Cuando la aportación pueda ser considerada original o sustancial el estudiante que ha elaborado el TFM será reconocido como cotitular de los derechos de propiedad intelectual o industrial que le pudieran corresponder de acuerdo con la legislación vigente.

10. Periodo de Vigencia



Este compromiso entrará en vigor en el momento de su firma y finalizará por alguno de los siguientes supuestos:

- Cuando el estudiante haya defendido su TFM.
- Cuando el estudiante sea dado de baja en el Máster en el que fue admitido.
- Cuando el estudiante haya presentado renuncia escrita a continuar su TFM.

- En caso de incumplimiento de alguna de las clausulas previstas en el presente documento o en la normativa reguladora de los Estudios de Posgrado de la Universidad Complutense.

La superación académica por parte del estudiante no supone la pérdida de los derechos y obligaciones intelectuales que marque la Ley de Propiedad Intelectual para ambas partes, por lo que mantendrá los derechos de propiedad intelectual sobre su trabajo, pero seguirá obligado por el compromiso de confidencialidad respecto a los proyectos e información inédita del tutor.

Firmado en Madrid, a 3 de agosto de 2019

El estudiante de Máster	El Tutor/es
Andrea Alonso Español	Bettina Alonso Álvarez
Fdo.:	Fdo.:
	

SR. COORDINADOR DEL MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

ANEXO I: DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

D./Dña. Andrea Alonso Español con NIF 52884483P, estudiante de Máster en la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid en el curso 2018 -2019, como autor/a del trabajo de fin de máster titulado “Actividad antimicrobiana de ácidos grasos Omega-3 frente a bacterias patógenas orales en un modelo subgingival multiespecie validado de *biofilm in vitro*”.

y presentado para la obtención del título correspondiente, cuyo/s tutor/ es/son:

Bettina Alonso Álvarez

DECLARO QUE:

El trabajo de fin de máster que presento está elaborado por mí y es original. No copio, ni utilizo ideas, formulaciones, citas integrales e ilustraciones de cualquier obra, artículo, memoria, o documento (en versión impresa o electrónica), sin mencionar de forma clara y estricta su origen, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía. Así mismo declaro que los datos son veraces y que no he hecho uso de información no autorizada de cualquier fuente escrita de otra persona o de cualquier otra fuente.

De igual manera, soy plenamente consciente de que el hecho de no respetar estos extremos es objeto de sanciones universitarias y/o de otro orden.

En Madrid, a 3 de agosto de 2019

Fdo.:



Esta DECLARACIÓN debe ser insertada en primera página de todos los trabajos fin de máster conducentes a la obtención del Título.

“Lo mejor que se puede compartir es el conocimiento”

Alain Ducasse

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mi tutora, la Dra. Bettina Alonso Álvarez, quien ha depositado su confianza en mí para realizar esta investigación, por su guía y consejo brindándome en todo momento su atención, tiempo y dedicación. Ha sido un honor tenerte de profesora, maestra y tutora. Y, en conjunto con el Dr. Mariano Sanz, el Dr. David Herrera y la Dra. Elena Figuero, gracias por prestarme la oportunidad de involucrarme en su grupo de investigación, así como de aprender de grandes maestros.

Agradecimientos también al personal del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid y, en especial, a la Dra. María Sánchez a la que estoy inmensamente agradecida por transmitirme su pasión por el mundo de la microbiología, por mostrarse siempre cercana, disponible y atenta, así como por tener siempre disponibles unas palabras de aliento y afecto.

A mi compañero y amigo, el doctorando Honorato Ribeiro-Vidal, por ser un ejemplo a seguir, así como una inspiración para mí a todos los niveles y no sólo en el ámbito académico. Pero, sobre todo, por brindarme siempre su apoyo, cariño y confianza. Te estaré siempre agradecida.

A mi familia, por ser mi apoyo incondicional y mi pilar fundamental y, sobre todo, por su paciencia.

A mis compañeros de máster y amigos.

A todos, muchas gracias.

RESUMEN

Antecedentes y Objetivos: Investigaciones previas han demostrado la capacidad antimicrobiana de los extractos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) n-3 de cadena larga frente a varios patógenos periodontales en estado planctónico. Sin embargo, la mayor parte de las bacterias en la naturaleza, y por ende en la cavidad oral, se encuentran organizadas en *biofilms*. No obstante, la literatura existente sobre el efecto de estos extractos en los patógenos periodontales organizados en modelos de *biofilm in vitro* es todavía escasa, o se trata de modelos de *biofilms* mono-especie. Por esta razón, el objetivo de este estudio es analizar de manera independiente la capacidad antibacteriana de dos extractos de ácidos grasos n-3 de cadena larga: ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), en un modelo validado de *biofilm* multi-especie formado *in vitro*, constituido por *Streptococcus oralis*, *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella parvula* y los patógenos periodontales *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Material y Métodos: Teniendo en cuenta las MBCs y las MICs observadas de las seis especies bacterianas implicadas, se utilizó un modelo validado de *biofilm* multi-especie *in vitro*, para evaluar la capacidad antibacteriana de los extractos de EPA y DHA (100 µM), frente a las especies bacterianas organizadas en *biofilm*, tras 60 segundos de exposición. Para ello, se realizó el recuento de las bacterias -expresadas como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL)- mediante la técnica reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés). Además, la vitalidad celular de los *biofilms* fue analizadas por microscopía de barrido laser confocal (CLSM, por sus siglas en inglés). Con relación al análisis estadístico, la variable dependiente seleccionada -para valorar el efecto antibacteriana de DHA y EPA de manera independiente- fue el número de UFC/mL viables presentes en el *biofilm*. Para contrastar la normalidad de la distribución de los datos estos fueron sometidos al test de *Shapiro-Wilk*. El efecto de cada extracto (variables independientes) y su interacción con las

variables dependientes, se evaluó mediante el test paramétrico ANOVA y las correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los datos se expresaron como medias \pm desviación estándar y como el porcentaje medio de inhibición. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con $p < 0,05$.

Resultados: Con respecto a la capacidad antibacteriana, los extractos de DHA y EPA (100 μ M) provocaron reducciones estadísticamente significativas en las UFC/mL viables de todas las bacterias en el modelo de *biofilm in vitro* - *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*- tras 60 segundos de exposición. Alcanzándose reducciones de hasta tres órdenes de magnitud con respecto al control negativo (PBS) en el caso de DHA y de dos (*A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*) o uno (*S. oralis*, *V. parvula*, *A. actinomycetemcomitans*) en el caso de EPA.

Conclusiones: Los extractos de EPA y DHA presentan capacidad antimicrobiana frente a seis especies bacterianas (*S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, y los patógenos periodontales *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* y) organizadas en *biofilm*, de manera significativa frente a todas ellas.

Palabras clave: ácidos grasos; ácido docosahexaenoico; ácido eicosapentaenoico; periodontitis; *biofilms* orales; *S. oralis*; *A. naeslundii*; *V. parvula*; *F. nucleatum*; *P. gingivalis*; *A. actinomycetemcomitans*.

ABSTRACT

Background and Objectives: Previous studies have reported the antimicrobial effects of long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids extracts against periodontal pathogens in planktonic state. Nonetheless, most of the bacteria in nature, and thus in the oral cavity, are organized in *biofilm* state. Notwithstanding, the existing literature on the effect of these extracts on periodontal pathogens organized in *in vitro biofilm* models is still limited or is linked to mono-species *biofilm* models. Accordingly, the aim of this study is to analyze, in an independent approach, the antimicrobial capacity of long chain omega-3 fatty acids extracts: docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), in a validated multi-species *in vitro biofilm* model, constituted by *Streptococcus oralis*, *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella parvula*, and the periodontal pathogens *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Material and Methods: Based on the MBCs and the MICs of the six bacterial species involved, a validated *in vitro biofilm* model was used to evaluate the antibacterial activity of EPA and DHA extracts (100 μ M) against bacteria organized in *biofilms*, after 60 seconds of exposure. With this objective, bacterial counts were performed using the real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technique. Besides, the cellular vitality of the *biofilms* was assessed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). In regard to the statistical analysis, the dependent variable selected -to analyze the antibacterial effect of EPA and DHA in an independent approach- was the viable CFU/mL of the six bacterial species present on the *biofilm*. To check the normality of the data distribution, the *Shapiro-Wilk* test was performed. The effect of each extract (independent variables) and its interplay with the dependent variables was assessed by the parametric ANOVA test and Bonferroni's corrections for multiple comparisons. Data were expressed as means \pm standard deviation and as mean percentage of inhibition. The results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results: According to the antibacterial capacity, EPA and DHA extracts (100 μ M) triggered significant reductions on viable CFU/mL of all bacteria included in the *biofilm in vitro* model - *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*- after 60 seconds of exposure. Achieving reductions up to three orders of magnitude with regard to the negative control (PBS) in the case of DHA and of two (*A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*) or one (*S. oralis*, *V. parvula*, *A. actinomycetemcomitans*) in the case of EPA.

Conclusions: Natural extracts of EPA and DHA display antibacterial capacity against six bacterial species (*S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, and the periodontal pathogens *F. nucleatum*, *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*) organized in *biofilm*, in a statistically significant way against all of them.

Key words: fatty acids; docosahexaenoic acid; eicosapentaenoic acid periodontitis; oral *biofilms*; *S. oralis*; *A. naeslundii*; *V. parvula*; *F. nucleatum*; *P. gingivalis*; *A. actinomycetemcomitans*.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	16
RESUMEN	18
ABSTRACT	20
1 INTRODUCCIÓN	26
2 OBJETIVOS	46
2.1 Objetivos generales	46
2.2 Objetivos específicos	46
3 HIPÓTESIS DE TRABAJO	46
4 MATERIAL Y MÉTODOS	48
4.1 Ácidos grasos Omega-3	48
4.2 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo	48
4.3 Experimentos sobre la capacidad antimicrobiana de EPA y DHA	51
4.3.1 Efecto antibacteriano frente a las bacterias en estado planctónico	51
4.3.2 Efecto en la viabilidad bacteriana en un modelo de <i>biofilm</i> oral <i>in vitro</i>	53
4.4 Extracción de ADN y análisis del <i>biofilm</i> mediante qPCR	56
4.5 Análisis del <i>biofilm</i> mediante CLSM	60
4.6 Análisis del <i>biofilm</i> mediante SEM	62
4.7 Análisis estadístico	63
5 RESULTADOS	66
5.1 MIC y MBC de las especies bacterianas en planctónico frente a EPA y DHA	66
5.2 Efecto antibacteriano en el modelo de <i>biofilm in vitro</i> del extracto de DHA	67
5.2.1 Análisis mediante la técnica de qPCR	67
5.2.2 Análisis mediante Microscopía Láser Confocal (CLSM)	71
5.2.3 Análisis mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	72
5.3 Efecto antibacteriano en el modelo de <i>biofilm in vitro</i> del extracto de EPA	74
5.3.1 Análisis mediante la técnica de qPCR	74
5.3.2 Análisis mediante Microscopía Láser Confocal (CLSM)	78
5.3.3 Análisis mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	79
6 DISCUSIÓN	82
7 CONCLUSIONES	90
8 APÉNDICES	92
8.1 Resultados Test Kruskal Wallis	92
8.1.1 DHA	92
8.1.2 EPA	93
8.2 Abreviaturas	94
8.3 Divulgación de los resultados de esta investigación	97
8.3.1 Comunicaciones formato Póster en congresos nacionales	97
8.3.2 Comunicaciones Orales en congresos nacionales e internacionales	97

8.4	Índice de figuras	98
8.5	Índice de tablas	102
9	BIBLIOGRAFÍA	106

1 INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad crónica multifactorial de origen inflamatorio asociada a un *biofilm* disbiótico, caracterizada por la destrucción progresiva de los tejidos dentarios de soporte. Sus características primarias incluyen la pérdida de tejidos de soporte periodontal, el cual se manifiesta como pérdida de inserción clínica, pérdida ósea radiográfica, presencia de bolsas periodontales y sangrado gingival (Papapanou y cols. 2018).

Las enfermedades periodontales son actualmente patologías altamente prevalentes a nivel mundial (Papapanou, 2012; Pihlstrom, Michalowicz, y Johnson, 2005), y suponen uno de los factores más importantes que contribuyen a la pérdida dentaria (Heitz-Mayfield y cols. 2003; Lang y Lindhe, 2015; Richards, 2014; Schatzle y cols. 2003). Frencken y colaboradores en 2017 incluso afirman que la periodontitis es la sexta condición más común a nivel mundial (Frencken y cols. 2017).

Según el *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) 2009-2012 en Estados Unidos se ha registrado una **prevalencia** del 46% de periodontitis en adultos ≥ 30 años, lo cual se corresponde con un 64.7 millones de sujetos afectados por esta patología en Estados Unidos, siendo el 8.9% periodontitis severa. En sujetos de más de 65 años, esta cifra asciende hasta un 85% (Chung, Song, Lee, y Choi, 2011; Eke y cols. 2015).

De forma similar, en Europa, se estima que entorno al 50% de la población adulta sufre periodontitis, con más del 10% de la población afectada por formas severas de la enfermedad (Carasol y cols. 2016; Konig, Holtfreter, y Kocher, 2010; Schutzhold y cols. 2015).

Cabe destacar que España es el país de la Unión Europea con mayor esperanza de vida al nacer, situándose esta en los 83 años (OECD 2017) y que en los últimos años se ha observado una disminución en el número de dientes perdidos y en el porcentaje de pacientes totalmente desdentados (Bravo Pérez

y cols. 2016; Kassebaum y cols. 2014). Todo ello parece indicar que la prevalencia de la periodontitis continuará ascendiendo en los próximos años (Rodríguez y Calvo, 2011). Esta alta prevalencia de las formas severas de periodontitis se considera un importante problema de salud pública, no solo por sus implicaciones orales (pérdida dentaria y de función masticatoria) sino también por sus efectos en la vida social y calidad de vida de los que la padecen (Montero, Yarte, Bravo, y Lopez-Valverde, 2011; Papapanou y cols. 2018; Tonetti, Jepsen, Jin, y Otomo-Corgel, 2017).

La actual **clasificación de las enfermedades periodontales**, aceptada mundialmente por la Federación Europea de Periodoncia (EFP, por sus siglas en inglés) y la Academia Americana de Periodoncia (AAP, por sus siglas en inglés), fue desarrollada en el último World Workshop celebrado en 2017. En este se propuso un sistema de clasificación según el cual las formas previamente reconocidas como “crónicas” o “agresivas” ahora se agrupan como una categoría única: “periodontitis”, siendo adicionalmente clasificadas mediante un sistema multidimensional de “estadios” y “grados”. El estadio depende principalmente de la severidad de la patología presente así como de la complejidad del manejo de la enfermedad, mientras que el grado proporciona información adicional de las características biológicas de la enfermedad incluyendo un análisis del ritmo de progresión basado en la historia clínica, evaluación del riesgo de progresión futura, análisis de la posible escasa respuesta al tratamiento y evaluación del riesgo de que la enfermedad o su tratamiento afecte negativamente a la salud general del paciente (Papapanou y cols. 2018).

Entre las enfermedades orales, la caries dental y las enfermedades periodontales, incluyendo gingivitis y periodontitis están causadas por comunidades bacterianas estructuradas en matrices de polisacáridos extracelulares organizadas en **biofilms** y adheridas a las superficies dentarias disponibles (superficie dental, restauraciones dentales, implantes, mucosa oral, etcétera) (Sanz y cols. 2017; Whittaker, Klier, y Kolenbrander, 1996).

Las características de las superficies sobre las que se forman estos *biofilm* tienen una importante influencia en el tipo de comunidades bacterianas que participan, en la proporción de bacterias unidas a la superficie, en el fenotipo bacteriano o en la expresión de los factores de virulencia y/o polisacáridos extracelulares (Cabal y cols. 2012; Rizzello y cols. 2011; Sanchez, Llama-Palacios, y cols. 2014; Teughels, Van Assche, Sliepen, y Quirynen, 2006).

Por lo tanto, se puede determinar que la placa dental es un *biofilm* complejo y dinámico compuesto por más de 800 especies bacterianas distintas, aunque se prevé que este número aumente con el desarrollo de nuevas tecnologías que permitirán el estudio de otras especies (Filoche, Wong, y Sissons, 2010). Este *biofilm* bacteriano se desarrolla de forma secuencial y reproducible (Diaz y cols. 2006) y la asociación entre las distintas bacterias que forman el *biofilm* oral no se produce de manera aleatoria, sino que hay asociaciones específicas entre las especies bacterianas (Socransky, Haffajee, Cugini, Smith, y Kent, 1998). De hecho, a los pocos minutos de realizar la eliminación mecánica del *biofilm* dental se forma sobre la superficie del esmalte la película adquirida: esta se compone de moléculas derivadas del huésped y contiene receptores (mucinas, aglutininas, proteínas ricas en prolina, proteínas ricas en fosfatos y enzimas) a los cuales se unen los colonizadores primarios (Kolenbrander y cols. 2002), estos son principalmente especies de *Actinomyces*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Streptococcus* y *Veillonella* (Diaz y cols. 2006). El grupo de colonizadores secundarios está formado fundamentalmente por *Fusobacterium nucleatum*. Esta bacteria Gram negativa se encuentra en gran número, tanto en localizaciones enfermas como sanas y en la organización espaciotemporal del *biofilm* se sitúa entre los colonizadores iniciales y tardíos, ya que es capaz de co-agregarse con todos ellos, es decir, sirve como “puente” entre ambos grupos de bacterias. Los colonizadores tardíos poseen un alto potencial periodonto-patógeno y entre ellos destacan las especies *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tannerella forsythia* (Kolenbrander y cols. 2002; Kolenbrander, Ganeshkumar, Cassels, y Hughes, 1993).

Aunque la mayoría de estos microorganismos que colonizan las superficies dentarias, tanto a nivel supra como subgingival, son compatibles con la salud periodontal (Beikler y Flemmig, 2011), se han definido patógenos clave relacionados con el inicio y progresión de la periodontitis (Paster y cols. 2001; Socransky y Haffajee, 2005). En particular, *P. gingivalis* se ha identificado como un patógeno clave, desencadenando el estado disbiótico que altera la comunidad de patógenos comensales y, provoca un estado de inflamación crónica (Hajishengallis y Lamont, 2012; Sanz y cols. 2017).

Este concepto de la especificidad bacteriana en las enfermedades periodontales ha sido ampliamente aceptado por muchos autores (Papapanou, 2002; Socransky y Haffajee, 2005; Socransky y cols. 1998). De hecho, son muchos los estudios que han tratado de asociar directamente la presencia de diferentes patógenos a nivel oral con el diagnóstico de periodontitis, registrando una gran variedad de resultados en las diferentes poblaciones y ambientes (Gajardo y cols. 2005; Haffajee y cols. 2004; Herrera, Contreras, y cols. 2008; Sanz y cols. 2000). Pero es importante tener en cuenta que la presencia de estos patógenos periodontales no sólo se ha determinado a nivel oral, sino que también se han encontrado a nivel sanguíneo en pacientes con periodontitis. Este hecho se asociado principalmente con intervenciones periodontales, pero también tras la realización de actividades cotidianas como la masticación (Forner, Larsen, Kilian, y Holmstrup, 2006), cepillado de dientes (Hartzell, Torres, Kim, y Wortmann, 2005), o utilización de la seda dental (Crasta y cols. 2009). Estas especies bacterianas son capaces de alcanzar el torrente sanguíneo y colonizar localizaciones lejanas, pudiendo facilitar, por ejemplo, el desarrollo y progresión de lesiones ateroscleróticas (Figuero y cols. 2011).

Es importante tener en cuenta que las relaciones entre estas bacterias embebidas en el *biofilm* pueden ser de simbiosis, cuando existe una relación beneficiosa entre las bacterias que lo conforman y entre estas y el hospedador, o esta relación puede ser de disbiosis, que consiste en una alteración en la comunidad de microorganismos asociada con el estado de salud, y esto resulta en el desarrollo de una patología (Sanz y cols. 2017).

Concretamente, con relación a la periodontitis, la disbiosis se caracteriza por un aumento en la diversidad de microorganismos, esto puede ser el resultado de una débil respuesta inmune local, un aumento de la disponibilidad de nutrientes (especialmente en el fluido crevicular) o por la aparición de nichos como la bolsa periodontal (Camelo-Castillo y cols. 2015; Paster y cols. 2001).

Aunque la organización en el *biofilm* y el estado de disbiosis actúan como elementos clave en el inicio de la periodontitis, la destrucción de los tejidos periodontales se produce como consecuencia de la respuesta inmunitaria desencadenada en el huésped. Por lo tanto, se afirma que las bacterias son necesarias, pero no suficientes para el desarrollo de la periodontitis, y la mayor parte de la destrucción tisular y las características clínicas se atribuyen actualmente a la desregulación de la respuesta inmune del huésped (Kornman, 2008; Preshaw y Taylor, 2011). De hecho, en la mayoría de los individuos, el aspecto protector de la respuesta del huésped manejará el desafío bacteriano hacia los tejidos periodontales, mediante neutrófilos e inmunidad mediada a nivel celular, limitando la extensión de la destrucción tisular y permitiendo el retorno a la homeostasis (Gemmell y Seymour, 2004). Por el contrario, si el desafío microbiano y la destrucción tisular no son manejados adecuadamente por la respuesta inflamatoria del huésped, la lesión puede progresar a un estado de inflamación crónica. Esta inflamación crónica y descontrolada subyace a un elevado número de condiciones sistémicas, entre ellas, la periodontitis crónica (Narasimha Das, 2013).

A esta compleja interacción entre las bacterias y la respuesta del sistema inmune del hospedador, se le suma la influencia de factores de riesgo genéticos y adquiridos como la susceptibilidad del individuo, los mecanismos de defensa del huésped o la presencia de factores ambientales de riesgo para el establecimiento y el desarrollo de la enfermedad, considerándose por ello la periodontitis una enfermedad multifactorial (Cullinan y cols. 2001; Page y Kornman, 1997; Sanz y Chapple, 2010; Seymour y Taylor, 2004).

Con relación al **tratamiento de periodontitis**, este se basa en la eliminación del agente causal y en el control de la infección, eliminando para ello el *biofilm* bacteriano que se encuentra a nivel supra y subgingival. Esto puede conseguirse con una instrumentación mecánica no quirúrgica (Cobb, 2002) o quirúrgica (Heitz-Mayfield, Trombelli, Heitz, Needleman, y Moles, 2002), siendo el objetivo de estos tratamientos el control de las bacterias patógenas en las bolsas periodontales (Cobb, 2002; Cobb y cols. 2002; Van der Weijden y Timmerman, 2002). Por lo tanto, se puede concluir que la prevención de la patología depende del control del *biofilm* (Meyle y Chapple, 2015).

El problema que se plantea es que mientras que este abordaje es generalmente efectivo reduciendo la inflamación y mejorando los parámetros clínicos (Cobb, 2002), una proporción de los pacientes no presentará respuesta al tratamiento o serán susceptibles a la progresión de la enfermedad y a la posterior pérdida dentaria (Hirschfeld y Wasserman, 1978). Esto es debido a que conseguir una reducción de los patógenos periodontales con el tratamiento mecánico de la enfermedad es difícil (Haffajee y cols. 1997; Haffajee, Teles, y Socransky, 2006; Mombelli, Gmur, Gobbi, y Lang, 1994a, 1994b; Mombelli, Schmid, Rutar, y Lang, 2000; Renvert, Wikstrom, Dahlen, Slots, y Egelberg, 1990) o no es siempre tan ideal como desearíamos (van der Weijden y Hioe, 2005), o es posible que la recolonización del ambiente subgingival ocurre tras la terapia (Magnusson, Lindhe, Yoneyama, y Liljenberg, 1984). Además, estos patógenos tienen las características de invadir otros nichos orales, como la lengua, las amígdalas o las mucosas, facilitando la futura recolonización de las localizaciones tratadas (Beikler y cols. 2004; Quirynen y Van Assche, 2011; Sachdeo, Haffajee, y Socransky, 2008).

Por lo tanto, el éxito a largo plazo de la terapia periodontal convencional depende del mantenimiento periodontal de manera regular y de la instrucción al paciente sobre cómo mantener un elevado nivel de higiene oral, para así alterar la formación del *biofilm* de manera continua (Axelsson y Lindhe, 1981; Axelsson, Nystrom, y Lindhe, 2004; Lindhe y Nyman, 1984).

En relación con las razones anteriormente mencionadas, se han desarrollado **estrategias antimicrobianas complementarias**, como antibióticos locales y/o sistémicos o antimicrobianos no específicos, por ejemplo, para aumentar los efectos antimicrobianos del desbridamiento mecánico (Krayner, Leite, y Kirkwood, 2010). Esta terapia antimicrobiana coadyuvante sistémica o local podría estar indicada para combatir la infección y recolonización por bacterias periodonto-patógenas, aunque solo parecen tener un éxito parcial (Herrera, Alonso, Leon, Roldan, y Sanz, 2008; Matesanz-Perez y cols. 2013).

De hecho, hasta la fecha, una amplia gama de agentes moduladores de la respuesta del huésped se ha investigado para su uso como monoterapia o terapia adyuvante para el manejo de la periodontitis, incluyendo inhibidores selectivos de la COX-2 (Bezerra y cols. 2000; Yen y cols. 2008), bifosfonatos (Lane y cols. 2005; Reddy y cols. 1995; Rocha y cols. 2001), estatinas (Saver, Hujoel, Cunha-Cruz, y Maupome, 2007), tetraciclinas (Caton y cols. 2000; Golub y cols. 1983) y antibióticos macrólidos (Bartold, du Bois, Gannon, Haynes, y Hirsch, 2013; Hirsch, Deng, y Laohachai, 2012).

El problema es que en los últimos años están surgiendo problemas relacionados con uso de algunos de estos agentes antimicrobianos (Dabholkar, Shah, Kathariya, Bajaj, y Doshi, 2016; Muller, Eick, Moritz, Lussi, y Gruber, 2017), como el desarrollo de resistencias bacterianas (van Winkelhoff, Herrera, Oteo, y Sanz, 2005) que representan una amenaza para la salud pública mundial y un importante problema económico (Barbieri y cols. 2017). A esto se suma el desarrollo de efectos nocivos gastrointestinales, renales o hepáticos derivados del uso de antibióticos (Hersh y Moore, 2008). Además, la utilización de antisépticos también puede causar irritación de las mucosas, tinción dental o la aceleración de la formación del cálculo dental, entre otros efectos (Serrano, Escribano, Roldan, Martin, y Herrera, 2015). Así mismo, el descubrimiento de que la resolución de la fase de inflamación es un proceso activo desencadenado por mediadores lipídicos endógenos ha puesto en duda el uso de agentes que

actúen mediante el bloqueo no-específico de las vías inmuno-inflamatorias del huésped (Van Dyke, 2007).

Estos hechos destacan la necesidad del desarrollo de nuevos abordajes y estrategias para la prevención y tratamiento de las enfermedades periodontales de una forma más eficiente y segura (Mah y O'Toole, 2001; Rams, Degener, y van Winkelhoff, 2014; Van Strydonck, Slot, Van der Velden, y Van der Weijden, 2012; van Winkelhoff, 2012) y realzan la necesidad de buscar, mejorar y desarrollar compuestos antimicrobianos naturales capaces de inhibir la proliferación de los patógenos bacterianos (Rams y cols. 2014; Serrano y cols. 2015; Van Strydonck y cols. 2012; van Winkelhoff, 2012).

En esta búsqueda de compuestos bacterianos alternativos, existe un creciente interés entorno al estudio de productos de origen natural para el tratamiento y la prevención de estas enfermedades, tales como los **ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) n-3 de cadena larga** (también conocidos como LCN3PUFAs). Estos presentan 18-22 átomos de carbono en la longitud de su cadena, con el primero de muchos dobles enlaces empezando por el tercer átomo de carbono (cuando contamos desde el extremo metilo que es el final de la molécula de ácidos grasos) (Calder, 2015).

Los LCN3PUFAs están basados en el pescado y en el aceite de pescado y dos de sus principales miembros son el ácido docosahexaenoico (22:6n-3, DHA) y el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA).

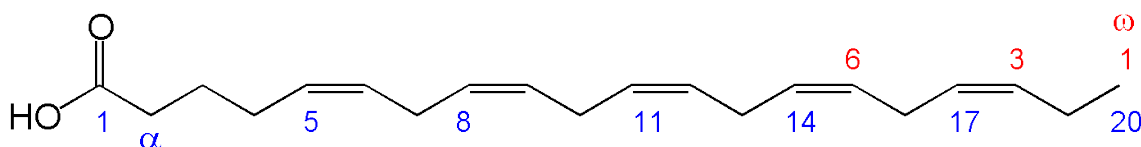


Figura 1 - Estructura química de EPA en conformación lineal con numeración desde ambas terminaciones. Adaptado de Desbois and Smith (2010).

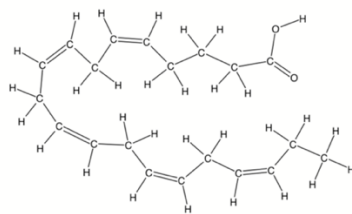


Figura 2 - Estructura química de EPA en conformación no lineal. Adaptado de Holub (2002).

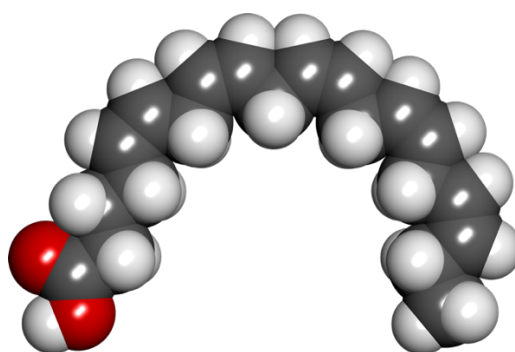


Figura 3 - Modelo espacial de EPA. Adaptado de una imagen creada por Ben Mills con Accelrys DS Visualizer.

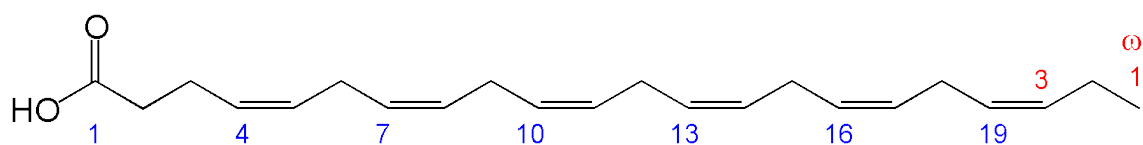
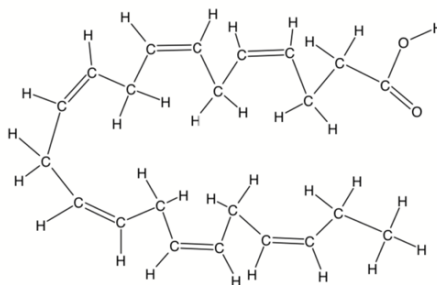


Figura 4 - Estructura química de DHA en conformación lineal con numeración desde ambas terminaciones. Adaptado de Desbois and Smith (2010).



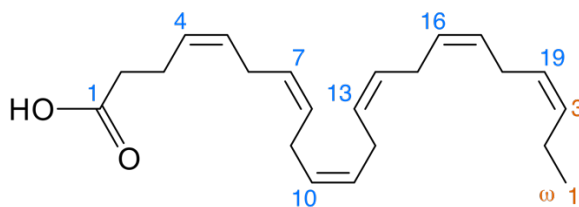


Figura 5 - Estructura química de DHA en conformación no lineal. Adaptado de Holub (2002).

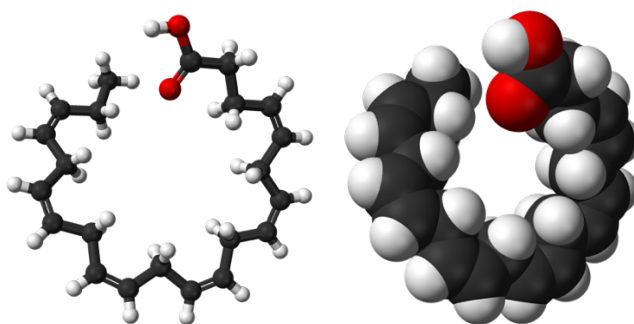


Figura 6 - Modelo espacial de DHA. Adaptado de una imagen creada por Ben Mills con Accelrys DS Visualizer.

Estas sustancias las encontramos en grandes niveles en muchos organismos marinos (Amiri-Jami, Lapointe, y Griffiths, 2014; Berge y Barnathan, 2005; Holub, 2002), de hecho los pescados grasos son una gran fuente de LCn3PUFAs, con una ración estándar de salmón se obtienen 1.5 g de EPA además de DHA, y con una ración estándar de caballa se obtienen hasta 3 g de estos ácidos grasos (Calder, 2009).

Por lo tanto, podemos determinar que la proporción de estos ácidos grasos en los tejidos está determinada principalmente por su proporción en la dieta según Simopoulos (2011) y, de hecho, se consideran componentes esenciales de la misma, debido a que su síntesis en humanos es limitada (Yates, Calder, y Ed Rainger, 2014).

Concretamente las dietas occidentales son principalmente altas en fuentes de los n-6 PUFAs linoleicos (soja, maíz y semillas de girasol) que, en el

organismo, son convertidos en ácido araquidónico (Cleland, James, y Proudman, 2006; James, Gibson, y Cleland, 2000) y son relativamente bajas en LCn3PUFAs. De hecho, en una dieta occidental común, entorno al 10-20% de los ácidos grasos son ácido araquidónico, 0,5-1% ácido eicosapentaenoico (EPA) y 2-4% ácido docosahexaenoico (DHA) (Dawson, Branch-Mays, Gonzalez, y Ebersole, 2014).

Tabla 1 – Contenido en EPA y DHA que se encuentra en pescado, marisco, otros alimentos y suplementos de aceite de pescado. Adaptado de Holub (2002).

Producto	Concentración de EPA y DHA
Pescado o marisco	
Caballa	2500 mg/100 g
Arenque	1700 mg/100 g
Salmón	1200 mg/100 g
Trucha	500 mg/100 g
Rodaballo	400 mg/100 g
Atún	400 mg/100 g
Camarón	300 mg/100 g
Bacalao	300 mg/100 g
Otros alimentos	
Huevos*	900 mg/180 mL
Suplementos de aceite de pescado	
Estándar	300 mg/ cápsula
Especial (Omega 600)**	600 mg/ cápsula

* Naturegg (Burnbrae Farms Ltd., Lyn, Ont.).

** Ocean Essentials (Ocean Nutrition Canada Ltd., Halifax, NS).

Sus efectos antiinflamatorios han sido estudiados en una serie de enfermedades crónicas inflamatorias: aterosclerosis, artritis, asma, psoriasis y enfermedad intestinal inflamatoria. Desde este punto de vista, se ha demostrado que los PUFAs pueden aportar distintos beneficios a la salud y números artículos científicos han demostrado la eficacia clínica del aceite de pescado con distintos mecanismos de acción: anti-arritmico, anti-trombótico, anti-aterosclerótico, o anti-inflamatorio, así como la mejoría de las funciones endoteliales, reducción de la presión sanguínea y reducción de la concentración de triglicéridos, entre otros (Dyall y Michael-Titus, 2008; Liu y Osawa, 2009; Marik y Varon, 2009; Raffaelli y cols. 2008).

Efectos fisiológicos de los ácidos grasos poliinsaturados

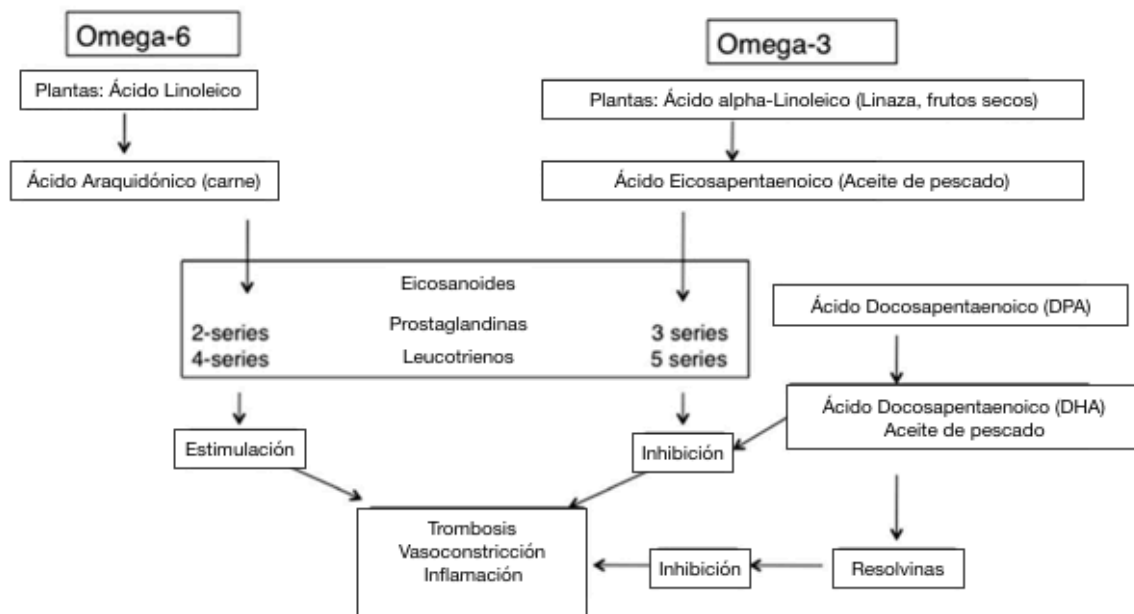


Figura 7 - Efectos fisiológicos descritos de los PUFAs. Adaptado de (Chee, Park, Fitzsimmons, Coates, y Bartold, 2016).

Entre las vertientes de investigación sobre la posible aplicación de los PUFAs, una amplia fracción de la investigación se ha centrado en si el consumo de pescado o de suplementos de aceite de pescado podrían mejorar los resultados del tratamiento de las patologías cardiovasculares.

De hecho, pruebas relacionadas con la dieta y el infarto (DART, por sus siglas en inglés) han investigado los efectos de las intervenciones dietéticas en la prevención secundaria del infarto de miocardio (MI, por sus siglas en inglés), siendo el primer gran estudio de este tipo (Burr y cols. 1989). Este estudio registró una disminución del 29% en la mortalidad total en hombres que consumían aceite de pescado dos veces por semana (un equivalente de 500-800 mg/día de LCn3PUFAs). Los resultados del ensayo DART fueron posteriormente confirmados por un gran estudio multicéntrico que incluyó a 11.323 pacientes con historia de infarto de miocardio, en el que EPA y DHA (850-882 mg) produjeron una reducción a nivel clínico importante y

estadísticamente significativa en los riesgos de muerte general y cardiovascularmente asociada (Singh y cols. 1997).

Tabla 2 – Posibles mecanismos de los efectos cardiovasculares descritos de EPA y DHA. Adaptado de (Holub, 2002).

Mecanismos de los efectos cardioprotectores de EPA y DHA
<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de las arritmias ventriculares malignas (a través del enriquecimiento en EPA y DHA de los lípidos cardíacos) • Incremento de la variabilidad del ritmo cardíaco (posiblemente a través del incremento del tono parasimpático, alteración de los niveles de citoquinas, u otros) • Efectos antitrombóticos y otros efectos en el sistema hemostático (ej. Disminución de la reactividad de las plaquetas sanguíneas, tiempos de sangrado moderadamente aumentados, reducción de la viscosidad plasmática) • Disminución de los lípidos (reducción de los niveles de triglicéridos y de VLDL (lipoproteína de muy baja densidad), frecuentemente acompañado de un ligero incremento del colesterol HDL (lipoproteína de alta densidad)) • Mejora de la relajación endotelial (a través del aumento de la vasodilatación dependiente y no dependiente del óxido nítrico) • Efecto inhibitorio de la aterosclerosis y la inflamación (a través de la inhibición de la proliferación de las células musculares lisas, alteración de la síntesis de eicosanoides, reducción de la expresión de las moléculas celulares de adhesión) • Supresión de la producción de citoquinas inflamatorias (interleuquinas, factor de necrosis tumoral) y mitógenos

También gran parte de la investigación se ha centrado en sus efectos en la artritis reumatoide (RA, por sus siglas en inglés), en la cual la destrucción tisular está dirigida por las citoquinas proinflamatorias y los eicosanoides derivados de ácido araquidónico (Yates y cols. 2014). Con relación a esto, una revisión sistemática reciente que incluye 23 ensayos controlados y randomizados, registró un beneficio clínico ligero pero importante por parte de los suplementos de aceite de pescado en los resultados de la RA, incluyendo la inflamación y el dolor de la articulación, duración de la rigidez matutina y la mejora de los efectos de los antiinflamatorios no esteroideos (NSAID, por sus siglas en inglés) (Miles y Calder, 2012).

Por otro lado, también se han realizado investigaciones centradas en sus efectos a nivel neurológico, ya que EPA y DHA han demostrado influir positivamente en un gran número de aspectos de la función y disfunción a este nivel. A pesar de esto, para muchos de estos efectos aun se desconoce el mecanismo de acción, aunque es muy probable que EPA y DHA actúen a través de un gran número de mecanismos, que posiblemente se solapen y que impliquen a varias dianas celulares. Estos LCn3PUFAs pueden modular la excitabilidad neurológica a través de sus efectos en los canales de sodio y de

calcio (Hong y cols. 2004; Vreugdenhil y cols. 1996) o a través de la activación de los canales TREK de potasio (Franks y Honore, 2004).

Así mismo, los PUFAs han atraído gran atención como potenciales agentes antimicrobianos debido a su amplio espectro de actividad y a que se ha demostrado que poseen elevados efectos inhibitorios frente a varias bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, sin desarrollar resistencias antibióticas significativas (Correia y cols. 2012; Correia y cols. 2013; Desbois, 2012; Desbois y Lawlor, 2013; Desbois, Mearns-Spragg, y Smith, 2009; Desbois y Smith, 2010; Mil-Homens, Bernardes, y Fialho, 2012).

Pese a esto, se sigue sin conocer exactamente cómo los PUFAs ejercen estas actividades antibacterianas, pero el principal objetivo de su acción parece ser la **membrana plasmática** y varios procesos esenciales que ocurren en ella.

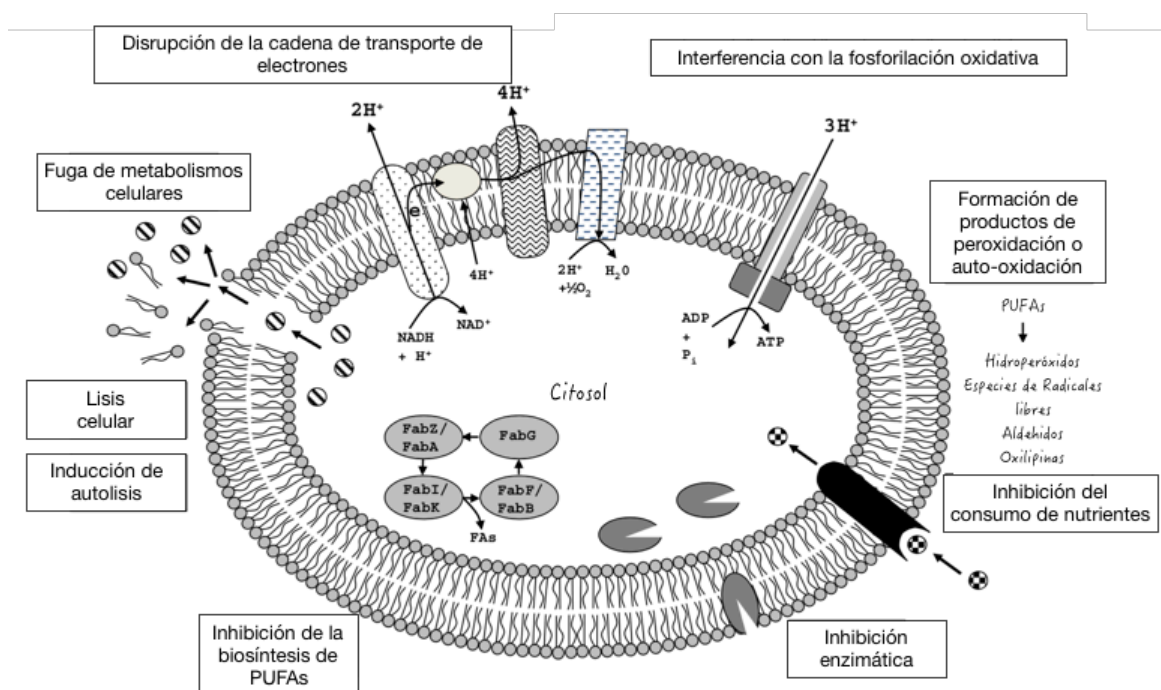


Figura 8 – Representación esquemática de las posibles dianas celulares y mecanismos antibacterianos de la acción antibacteriana de los PUFAs. Adaptado de (Desbois y Smith, 2010).

Por ejemplo, algunos de estos efectos se pueden atribuir a las propiedades que tienen los PUFAs para actuar como detergentes gracias a su

estructura anfipática, esto les permite interactuar con las membranas celulares para crear poros permanentes o transitorios de tamaño variable. Incluso en altas concentraciones, se cree que pueden solubilizar membranas mediante la liberación de grandes secciones de la doble membrana lipídica. Además, uno de los factores clave asociado al efecto de los PUFAs, y localizado a nivel de la membrana, es la alteración de la producción de energía causada por su interferencia con la cadena de transporte de electrones y la ruptura de la fosforilación oxidativa (Boyaval, Corre, Dupuis, y Roussel, 1995; Galbraith y Miller, 1973; Miller, Brown, y Morse, 1977; Shaikh, Jolly, y Chapkin, 2012; Sheu y Freese, 1972; Wieckowski y Wojtczak, 1998).

Otros procesos que pueden contribuir a la inhibición del crecimiento o muerte bacteriana y que están relacionados con la acción de los PUFAs a nivel de la membrana plasmática, incluyen la lisis celular, la inhibición de la actividad enzimática, el desajuste en el consumo de nutrientes y la generación de peróxidos tóxicos y de oxidación.

En otros estudios, se ha determinado que los PUFAs de la dieta se incorporan a los fosfolípidos de las membranas celulares, donde actúan como precursores de mediadores lipídicos implicados en procesos de señalización celular, expresión genética e inflamación, así como contribuyen a la integridad de la membrana celular y a mantener su fluidez (Dawson y cols. 2014; Silva, Barazzoni, y Singer, 2014).

De manera más específica, también se ha demostrado que EPA presenta actividad frente a dos cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* (MRSA), que, pese a no ser una bacteria asociada a periodontitis, se ha observado que se puede unir al titanio de los implantes. Por ello, los LCn3PUFAs pueden ser prometedores de cara a emplearlos como nuevos tratamientos frente a las infecciones de MRSA (Lacey y Lord, 1981). Además, Clarke y colaboradores en 2017 demostraron que la inyección ácidos grasos podría ser efectiva para tratar infecciones sistémicas de MRSA en modelos murinos (Clarke y cols. 2007).

Es destacable que cuando EPA se incluye en la dieta, ha sido “ampliamente reconocido como seguro” según el sistema de clasificación de la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (U.S. Food and Drug Administration 1997). Por lo tanto, considerando su potente actividad anti-MRSA y sus características no tóxicas, EPA, se trata de un ácido graso con origen en el pescado y con numerosos beneficios reportados a nivel de la salud (Kris-Etherton, Harris, y Appel, 2002). Así mismo, todavía no han sido descubiertas resistencias a los PUFAs, y no ha sido posible inducir un fenotipo resistente (Lacey y Lord, 1981; Laser, 1952; Petschow, Batema, y Ford, 1996; C. Q. Sun, O'Connor, y Robertson, 2003). Esto garantiza futuras investigaciones al ser seguro y con una proporción adecuada coste-beneficio, para combatir posiblemente otras bacterias a nivel oral.

Además del efecto previamente descrito a nivel de las membranas celulares, también se ha demostrado que los PUFAs tienen un efecto a nivel de la **producción de eicosanoides**. El metabolismo del ácido araquidónico progresa a través de dos vías principales que involucran a la lipoxigenasa para producir lipoxinas y ciclooxigenasas que a su vez producen prostaglandinas.

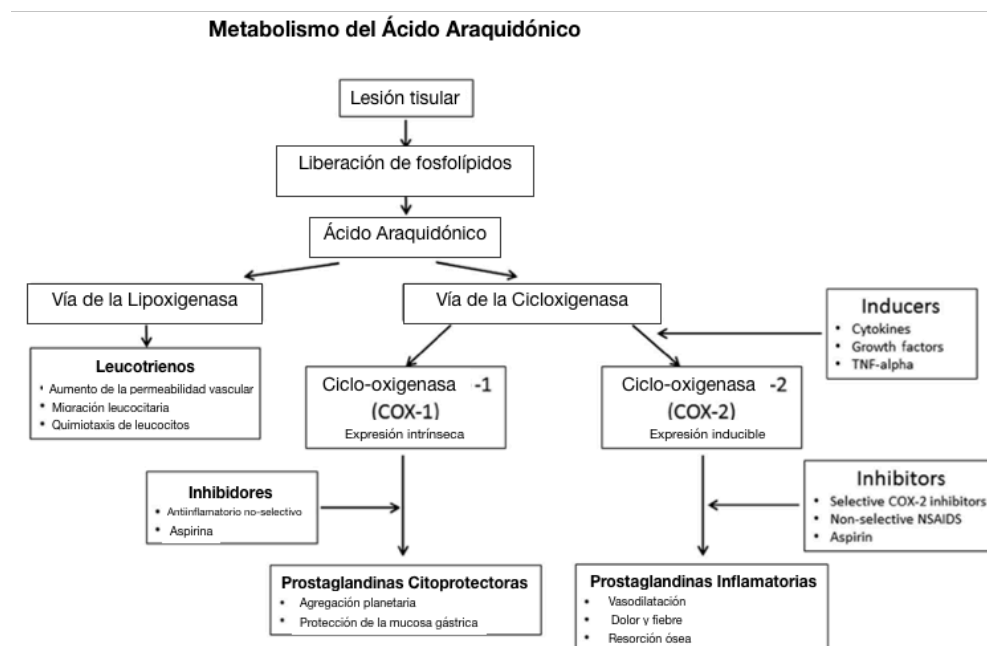


Figura 9 – Vías del metabolismo del ácido araquidónico. Adaptado de (Chee y cols. 2016).

Se ha demostrado que un incremento en el consumo dietético de LCn3PUFAs, como EPA y DHA, tiene como resultado una menor proporción de ácido araquidónico (AA) en los fosfolípidos de las células inflamatorias (Calder, 2009).

Por lo tanto, una dieta rica en LCn3PUFAs puede competir por AA a dos niveles: primero, mediante la incorporación en los fosfolípidos de las membranas celulares, reduciendo la proporción del sustrato disponible para los eicosanoides derivados de AA; y, en segundo lugar, compitiendo como sustrato por las vías de la cicloxigenasa (COX) y la lipoxigenasa (LOX) (Bagga, Wang, Farias-Eisner, Glaspy, y Reddy, 2003). Además, el uso de EPA por las vías de COX y LOX lleva a la producción de eicosanoides derivados de EPA que tienen reducidos efectos proinflamatorios en comparación con los eicosanoides derivados de AA (Bagga y cols. 2003; Calder, 2013b).

Así mismo, también se han descrito sus efectos a nivel del **estrés oxidativo**, ya que la acción de los suplementos de LCn3PUFAs en las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y en los antioxidantes, se considera un importante mecanismo de acción (Dawson y cols. 2014). Las ROS como peróxido de hidrógeno, superóxido y el radical hidroxil, son moléculas altamente reactivas (Silva y cols. 2014) y su producción por parte de los neutrófilos es un gran método de muerte de patógenos, pero tiene el potencial de causar daños secundarios en los tejidos del huésped (Nussbaum y Shapira, 2011). Por esta razón, el daño tisular que resulta del estrés oxidativo ha sido implicado como un factor en la patogenia de la periodontitis y, por consiguiente, como una potencial diana para la modulación de la terapia del huésped. Los suplementos de aceite de pescado a altos niveles (equivalentes a 5.4 g de EPA y 3.2 g de DHA) han demostrado disminuir la producción de ROS en los neutrófilos humanos (Fisher y cols. 1990; Luostarinen y Saldeen, 1996).

Además, también se han subrayado sus efectos a nivel de las **citoquinas proinflamatorias**, ya numerosos estudios de cultivo celular han confirmado que tanto EPA como DHA pueden inhibir la producción de IL-1 β , TNF- α e IL-6 en

una amplia variedad de células (Caughey, Mantzioris, Gibson, Cleland, y James, 1996; Endres y cols. 1989; Miles y Calder, 2012). De hecho, la inhibición de estas podría ser uno de los mecanismos que expliquen los efectos beneficiosos de los LCn3PUFAs en las enfermedades inflamatorias crónicas (Calder, 2009).

Otros estudios han registrado que EPA y DHA también pueden inhibir la producción de TNF- α evitando de este modo la activación de **NF-kB** (Lo, Chiu, Fu, Lo, y Helton, 1999; Novak, Babcock, Jho, Helton, y Espat, 2003; Vedin y cols. 2008). Debido a su sensibilidad redox, la inhibición de la activación NF-kB podría ser a través de la reducción de la producción de especies reactivas de oxígeno (Sanlioglu y cols. 2001).

Con relación a los **efectos específicos del aceite de pescado en la mejoría de los resultados de la terapia periodontal**, se han atribuido efectos sobre la **reducción de la inflamación**, gracias a la capacidad del aceite de pescado de reducir la producción de citoquinas y eicosanoides proinflamatorios (Caughey y cols. 1996; Endres y cols. 1989; Meydani y cols. 1991). Así mismo, los LCn3PUFAs de la dieta también han demostrado disminuir los niveles de ácido araquidónico (reducido en un 56%) y PGE2 (en un 83%) a nivel gingival en ratas (Alam, Bergens, y Alam, 1991).

Por otro lado, también son destacables sus efectos a nivel de la **reducción de la resorción ósea**, ya que estudios de cultivo celular han registrado que los LCn3PUFAs pueden inhibir la diferenciación, activación y función de los osteoclastos, lo que conlleva niveles reducidos de RANKL (Rahman, Bhattacharya, y Fernandes, 2008). Estos hallazgos se han replicado *in vivo* en modelos de pérdida ósea y periodontitis en roedores, donde los suplementos de LCn3PUFAs se asocian con la supresión de la expresión de citoquinas proinflamatorias, la supresión de la activación de NF-kB y de la formación y activación de osteoclastos, dando como resultado una menor resorción ósea (D. Sun y cols. 2003). Además, en ratas infectadas por *P. gingivalis* y alimentadas con aceite de pescado o de maíz, se produjo una pérdida ósea significativamente menor en el grupo de aceite de pescado, en

comparación con el grupo de la dieta basada en aceite de maíz (Bendyk, Marino, Zilm, Howe, y Bartold, 2009; Kesavalu y cols. 2007). Así mismo, un estudio en mujeres osteoporóticas que consumían suplementos de ácido gamma-linoleico y EPA mostró un incremento en la densidad ósea, sugiriendo que EPA tiene un efecto beneficioso en el metabolismo óseo y es seguro que se administre durante periodos prolongados de tiempo (Kruger, Coetzer, de Winter, Gericke, y van Papendorp, 1998).

También es remarcable la **actividad antimicrobiana de LCn3PUFAs**, que es lo que nos interesa especialmente en este estudio. De hecho, recientemente, se ha demostrado que tanto EPA como DHA muestran fuerte actividad antibacteriana frente a varios patógenos orales, incluyendo *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, y *Porphyromonas gingivalis* (a una concentración inhibitoria del 50 % de 1 a 10 µg/ml) (Huang y Ebersole, 2010). También en otro estudio microbiológico reciente se ha demostrado un amplio alcance de actividad antibacteriana tanto para EPA como DHA, incluyendo la inhibición de patógenos periodontales putativos como *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella intermedia* (Choi y cols. 2013).

Sin embargo, se sabe poco sobre su espectro de actividad o mecanismo de acción frente a estos patógenos periodontales, especialmente en forma de *biofilm*, siendo todavía desconocidos los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a su acción moduladora de la respuesta del huésped (Choi y cols. 2013; Huang y Ebersole, 2010; Serhan, 2007). Por esta razón, las propiedades antimicrobianas exactas de estos agentes continúan siendo investigadas.

Finalmente, y como justificación del estudio, consideramos que debido a los prometedores efectos antimicrobianos (Calder, 2013b, 2015) y propiedades antioxidantes significativas anteriormente mencionadas que muestran los PUFAs (Giordano y Visioli, 2014), es esperable que estos agentes puedan proporcionar efectos beneficiosos adicionales como coadyuvantes en el tratamiento de la periodontitis, proporcionando un abordaje antiinflamatorio y antibacteriano combinado para el manejo de esta patología.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

Avanzar en el conocimiento de la capacidad antimicrobiana de EPA y DHA, evaluando cada uno de ellos de manera independiente, frente a seis especies bacterianas (*S. oralis*, *V. parvula*, *A. naeslundii* y los patógenos periodontales *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum*), en un modelo validado de *biofilm in vitro*, sobre discos de hidroxiapatita (HA).

2.2 Objetivos específicos

- Investigar, para EPA y DHA, las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs, por sus siglas en inglés) y las concentraciones mínimas bactericidas (MBCs, por sus siglas en inglés) de las seis especies bacterianas en estado planctónico, que son las mismas que forman parte del modelo de *biofilm*;
- Estudiar el efecto antimicrobiano de EPA y DHA, evaluando cada uno de ellos de manera independiente, a través de las diferencias en el número de bacterias viables expresadas como UFC/mL, presentes en el *biofilm* subgingival generado *in vitro* en un modelo estático multiespecie.

3 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los extractos de EPA y DHA, tienen capacidad antimicrobiana frente a un modelo de *biofilm* subgingival formado *in vitro* que incluye los patógenos periodontales *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Ácidos grasos Omega-3

Los extractos de LCn3PUFAs empleados en este estudio se evaluaron en su forma FA-EE, aislados del aceite de pescado. Concretamente se han utilizado dos LCn3PUFAs insaturados predominantes - EPA y DHA - que vienen en ambos casos solubilizados en etanol (EtOH).

Estos productos son de la marca Cerilliant®, perteneciente a la casa comercial Sigma-ALDRICH®. (Figura 10).

Es importante destacar que, en este estudio, la capacidad antimicrobiana EPA y DHA ha sido analizada de manera independiente y sin realizar comparaciones entre ambos productos. Por lo que todos los procesos explicados a continuación han sido aplicados de manera independiente a ambos extractos, para estudiar su potencial actividad frente a las bacterias periodonto patógenas en un modelo de *biofilm*.



Figura 10 – EPA y DHA de la marca Cerilliant® perteneciente a la casa comercial Sigma-ALDRICH®.

4.2 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

Para la realización de este trabajo de investigación se necesitó del empleo de un modelo de *biofilm* subgingival validado por (Sanchez y cols. 2011). Se seleccionaron seis especies bacterianas que se incluían frecuentemente en la placa subgingival y que está formado por colonizadores iniciales (*Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*), tempranos (*Veillonella parvula*), secundarios (*Fusobacterium nucleatum*) y tardíos (*Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). (Tabla 3).

Tabla 3 – Cepas seleccionadas y condiciones de cultivo.

Cepa	Referencia
<i>Streptococcus oralis</i>	CECT ¹ 907T
<i>Actinomyces naeslundii</i>	ATCC ² 19039
<i>Veillonella parvula</i>	NCTC ³ 11810
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	DSMZ ⁴ 20482
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC ² 33277
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	DSMZ ⁴ 8324
<p>Leyenda: ¹CECT - Colección Española de Cultivos Tipo ²ATCC - American Type Cultures Collection ³NCTC – National Collection of Type Cultures ⁴DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und ZellKulturen</p>	

Se cultivaron las bacterias en placas con medio Agar Sangre (Oxoid nº2; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), suplementado con un 5% de sangre de caballo, Hemina (5 mg/L) y Menadiona (1 mg/L), en condiciones de anaerobiosis (10% H₂, 10% de CO₂ y N₂ en equilibrio), a 37°C, de 24 a 72h.

De todas las bacterias empleadas se realizaron previamente las curvas de crecimiento para el desarrollo de un modelo de *biofilm* estático, según lo descrito por Sanchez y colaboradores en 2011, inoculando de este modo una concentración constante de cada una de las cepas en los distintos experimentos y consiguiendo así la reproducibilidad del modelo (Sanchez y cols. 2011). (Figura 11).

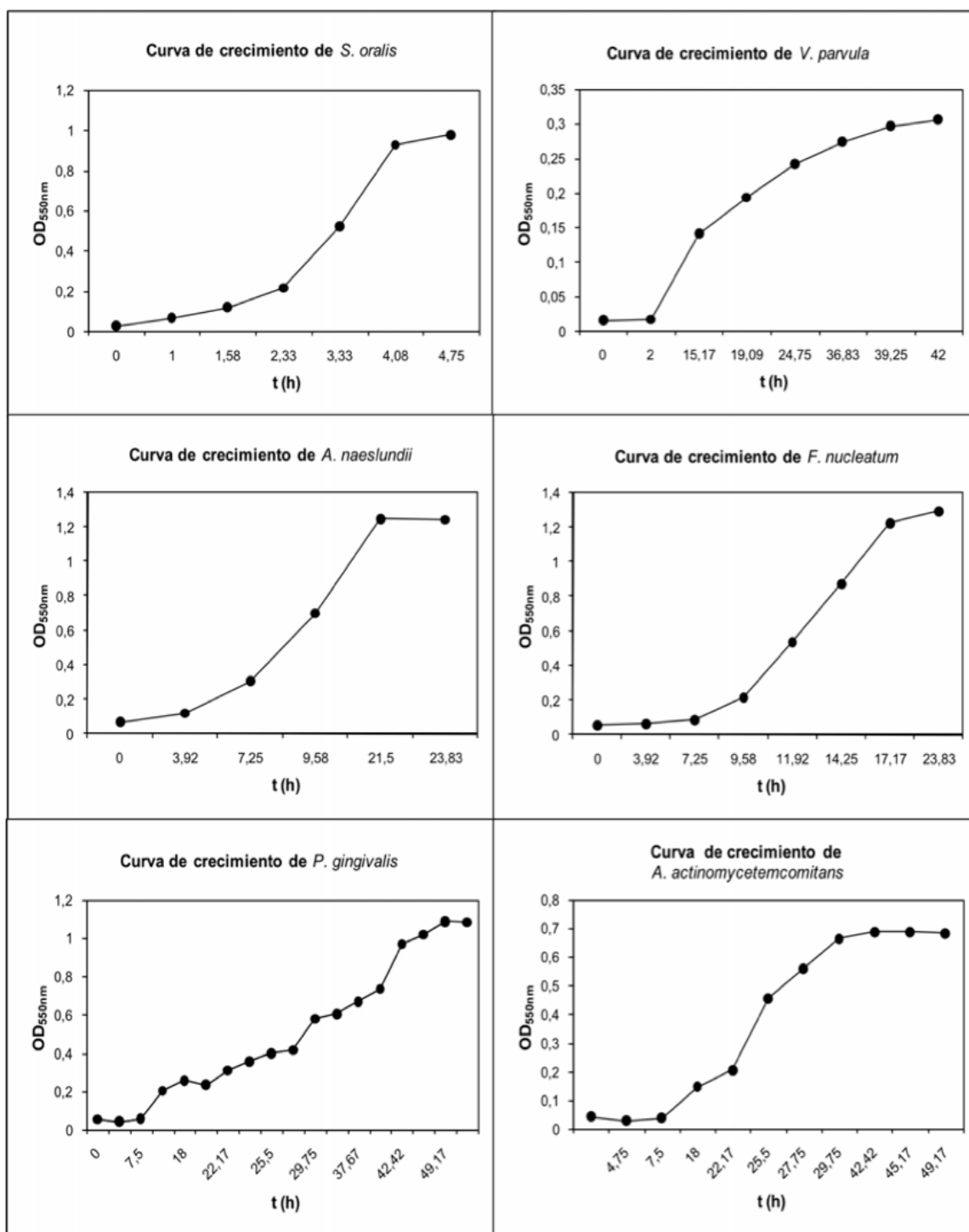


Figura 11 – Curvas de crecimiento de las especies bacterianas empleadas en el modelo de *biofilm* validado *in vitro* (Sanchez y cols. 2011). OD, Densidad óptica medida a 550 nm; t, tiempo; h, horas.

4.3 Experimentos sobre la capacidad antimicrobiana de EPA y DHA

4.3.1 Efecto antibacteriano frente a las bacterias en estado planctónico

Se utilizaron cultivos puros de las seis especies bacterianas, cultivándolos en anaerobiosis, en un medio rico en proteínas - *Brain-Heart Infusion* (BHI, por sus siglas en inglés) (Becton, Dickinson and Company; Becton, Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) modificado, suplementado con 2,5 g/L de mucina (Oxoid), 1,0 g/L de extracto de levadura (Oxoid), 0,1 g/L de cisteína (Sigma), 2,0 g/L de bicarbonato de sodio (Merck), 5,0 mg/mL de hemina (Sigma), 1,0 mg/mL de menadiona (Merck) y 0,25% (v/v) de ácido glutámico (Sigma). Los cultivos se mantuvieron en anaerobiosis a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento bacteriano en cada una de las cepas utilizadas. Para identificar la fase en la que se encontraba el crecimiento bacteriano se utilizó un espectrofotómetro, midiendo la densidad óptica (D.O.) a 550 nm (Figura 12).



Figura 12 – Espectrofotómetro de Optic Ivy System 2100-C; I.C.T.; La Rioja, España. Laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología, Universidad Complutense de Madrid

A continuación, se prepararon inóculos de cada especie bacteriana (*S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*). Cada inóculo estaba constituido por 190 μ L de la especie bacteriana correspondiente (ajustando la concentración final a 10^6 UFC/mL) y por 10 μ L de EPA y DHA a diferentes concentraciones (12,5 μ M/mL; 25 μ M/mL; 50 μ M/mL; 100 μ M/mL y 200 μ M/mL), dando como resultado un volumen final de 200 μ L. Se realizó una medición de la absorbancia (D.O.595 nm) a t=0 en el espectrofotómetro (Figura 12). Estos inóculos se sembraron en placas de cultivo celular de 96 micropocillos y se incubaron durante 48 horas, a 37° C, en anaerobiosis. Para garantizar la validez del ensayo se utilizaron controles negativos (medios de cultivo sin ningún inóculo/extracto de EPA o DHA) y controles positivos (bacterias sin ningún tratamiento), así como el objetivo del ensayo

(EPA y DHA disueltos en los medios de cultivo, de manera independiente). Se incluyó una solución de EtOH a la misma concentración que se encontraba en las soluciones comercializadas de EPA o DHA para descartar un efecto bactericida de este, ya que es utilizado para disolver los extractos, así como una solución de digluconato clorhexidina (CHX) al 0,2% para realizar una comparación con el máximo efecto antibacteriano esperable.

La absorbancia se midió mediante el espectrofotómetro a intervalos seleccionados, con el fin de determinar el crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo hasta que las bacterias alcanzaran la fase de crecimiento estacionario. (Figura 13).

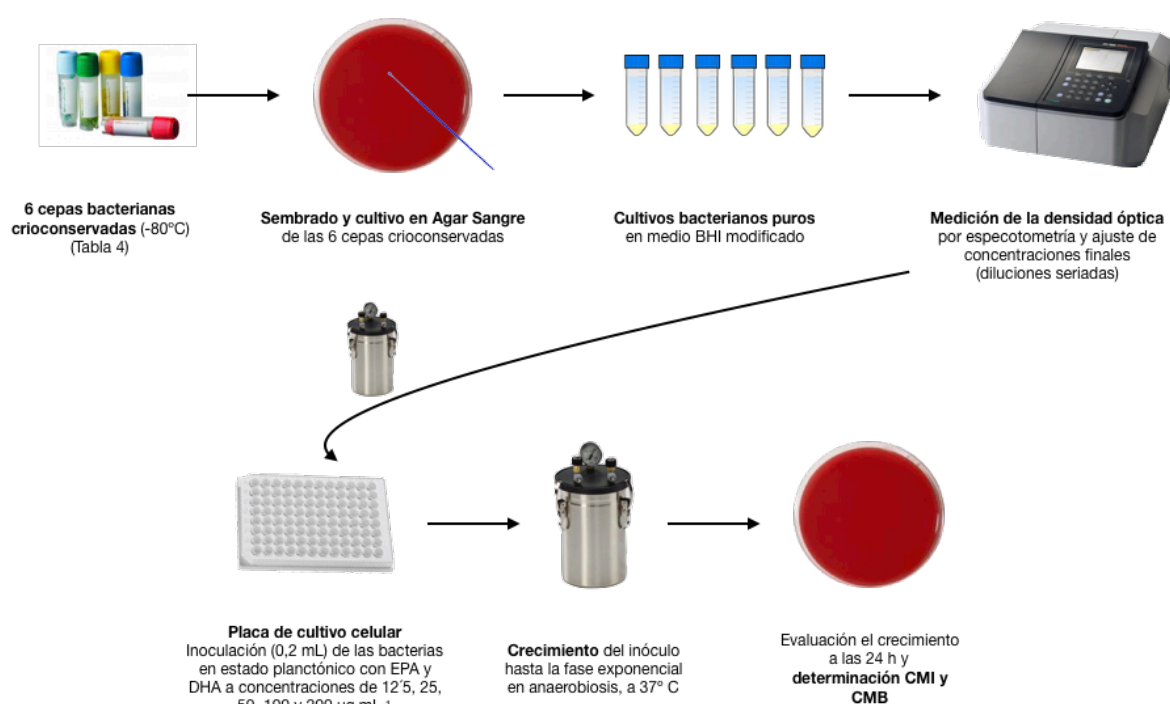


Figura 13 – Representación esquemática del cálculo de MIC y de MBC.

Se calculó la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) y la concentración mínima bactericida (MBC, por sus siglas en inglés) de cada especie bacteriana y se confirmó mediante el recuento microbiano en placas de medio agar sangre. De este modo, la menor concentración de los extractos de EPA y DHA que mostró inhibición de, al menos un 25% del crecimiento bacteriano, se consideró la MIC, mientras que la menor concentración de los mismos extractos en la que no se observó crecimiento bacteriano tras la incubación durante 72 horas, se consideró la MBC.

Esto se realizó con el objetivo de optimizar el método para evaluar, a posteriori y de manera independiente, el efecto antibacteriano de los extractos de EPA y DHA frente a las especies bacterianas previamente mencionadas en un modelo de *biofilm*. De este modo se determinó finalmente que en ambos extractos la dosis de 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ demostraba el mayor efecto antibacteriano sin encontrar diferencias estadísticamente significativas (datos no incluidos) con respecto a la máxima concentración probada (200 $\mu\text{M}/\text{mL}$), seleccionando por lo tanto la concentración de 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ para la realización del resto de experimentos.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado con sus respectivos controles.

4.3.2 Efecto en la viabilidad bacteriana en un modelo de *biofilm* oral *in vitro*

Se desarrolló un modelo de *biofilm* multiespecie *in vitro* previamente descrito por Sánchez y colaboradores en 2011 (Sanchez y cols. 2011).

Para ello, se incubaron cultivos puros de cada especie bacteriana en anaerobiosis, a 37°C, en 15 mL de medio BHI modificado hasta su fase exponencial (se utilizó un espectrofotómetro (Figura 12) para medir la D.O. a 550nm). A continuación, se preparó un preinóculo mixto con las seis especies bacterianas seleccionadas a la concentración ajustada por espectrofotometría en un medio BHI modificado (Sanchez y cols. 2011).

Tabla 4 - Cepas seleccionadas y su concentración final en el preinóculo.

Cepa	Concentración final (UFC/mL ¹)
<i>Streptococcus oralis</i>	10 ³
<i>Actinomyces naeslundii</i>	10 ⁵
<i>Veillonella parvula</i>	10 ⁵
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	10 ⁶
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10 ⁶
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	10 ⁶
Leyenda: ¹ UFC/mL: Unidades formadoras de colonias por mililitro.	

A continuación, se procedió a la formación del *biofilm* sobre los discos estériles de HA de 7 mm de diámetro y 1,8 mm de grosor (desviación estándar (DS) de 0.2 mm) (Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA, EE. UU.). Estos discos de HA fueron cubiertos con saliva estéril tratada durante 4 horas, a 37°C, en tubos de plástico estériles de forma previa al experimento. Después, los discos fueron introducidos en una placa de cultivo celular de 24 pocillos (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania), inoculando cada pocillo con 1,5 mL del inóculo mixto de las especies bacterianas.

Una vez realizado este proceso, dicha placa de cultivo celular fue puesta a incubar en condiciones de anaerobiosis (10% de H₂, 10% de CO₂ y N₂ en equilibrio), a 37°C, durante 72 h.

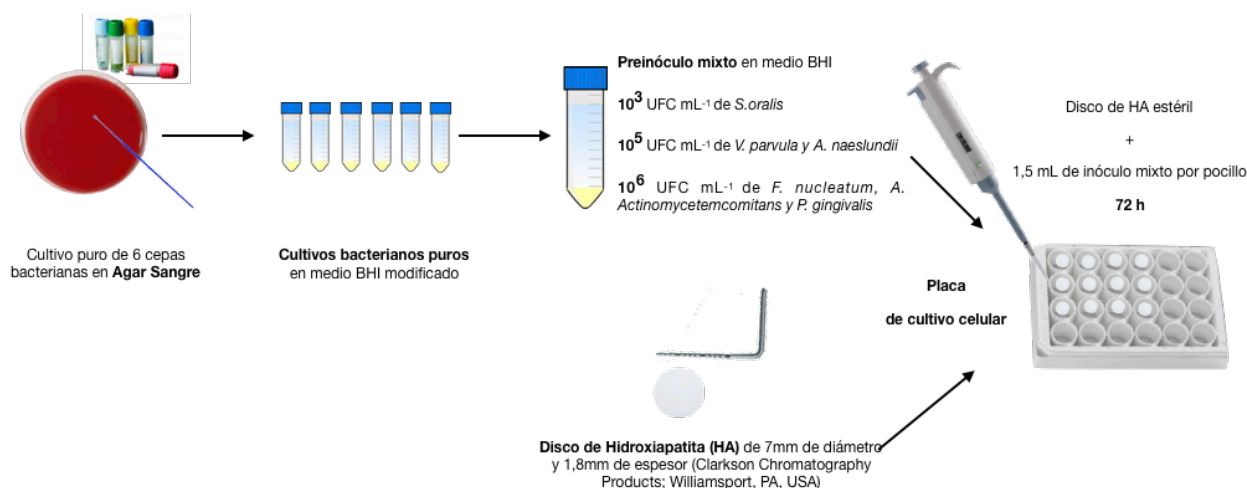


Figura 14 - Representación esquemática del modelo de *biofilm* subgingival multi-especies *in vitro*, según lo descrito por Sánchez y colaboradores en 2011 (Sanchez y cols. 2011). Tras cada paso, se incubó en condiciones de anaerobiosis (10% H₂, 10% de CO₂ y N₂ en equilibrio) a 37°C.

Tras 72 horas de incubación, los discos donde se han formado los *biofilms* fueron sumergidos durante 60 segundos a los tratamientos. Se seleccionaron estos tiempos debido a que son los mismos tiempos de exposición estándar establecidos para otros productos antimicrobianos comercialmente disponibles (por ejemplo, colutorios con CHX) (Davies, 2003; Donlan y Costerton, 2002; Mah y O'Toole, 2001). Se utilizó también PBS, como control negativo, EtOH (a la misma concentración que la que se encuentra en los productos que están siendo testados, para descartar el

efecto bactericida del solvente) y CHX al 0,2%, como control positivo de muerte total. (Figura 15).

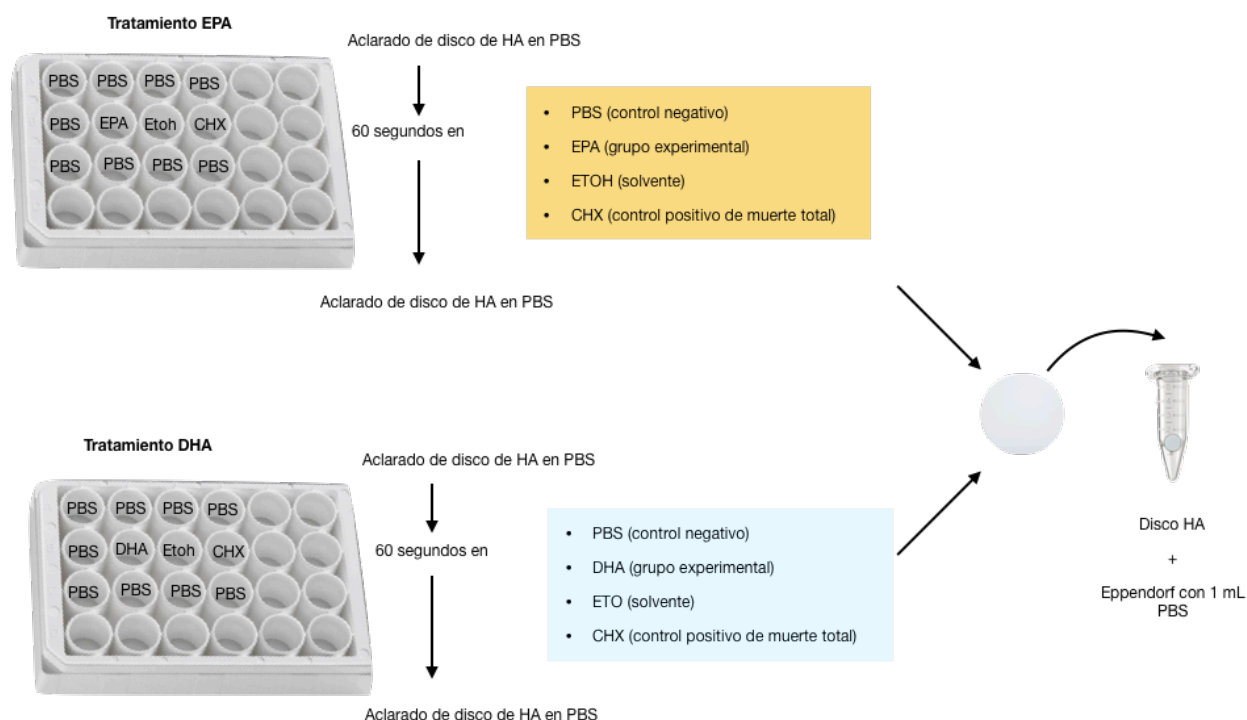


Figura 15 - Representación esquemática del modelo de evaluación de la capacidad antimicrobiana de EPA y DHA.

La valoración de la capacidad antibacteriana sobre los *biofilms* a las 72 horas se llevó a cabo mediante la determinación de la reducción del número de UFC/mL, mediante la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés).

El efecto de los tratamientos ha sido también observado de forma cualitativa mediante microscopía de barrido láser confocal (CLSM, por sus siglas en inglés) y microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés).

Del experimento se realizaron tres réplicas en diferentes días, utilizando nuevos cultivos bacterianos (con tríos de *biofilm* en cada réplica), n=9.

4.4 Extracción de ADN y análisis del *biofilm* mediante qPCR

Tras la realización de los anteriores experimentos, se recuperaron los *biofilms* y se lavaron de manera secuencial en 2 mL de PBS estéril (inmersión de 10 segundos por lavado), en tres ocasiones, para eliminar cualquier remanente de los extractos de EPA y DHA, así como bacterias no adheridas. A continuación, los *biofilms* fueron desprendidos de los discos de HA mediante un procedimiento de agitación vigorosa (mediante la utilización de vortex) durante 2 min en 1 mL de PBS.

Para discriminar entre el ADN de las bacterias vivas y muertas, se utilizó Propidio de Monoazida (PMA) (Biotium Inc., Hayward, CA, EE. UU.). Esta sustancia ha demostrado tener la capacidad de discriminar las bacterias viables y las bacterias irreversiblemente dañadas, impidiendo la replicación del ADN de estas últimas y, así, combinado con la qPCR, detectar el ADN solo procedente de las bacterias viables (Sanchez, Marin, y cols. 2014).

250 μ L de la suspensión obtenida de la disgregación de los *biofilm* se añadieron a un tubo de reacción que contenía PMA, con una concentración final de 100 μ M. A continuación, las muestras fueron sometidas a un periodo de incubación de 10 minutos, a 4°C, en la oscuridad. Una vez finalizado este proceso fueron sometidas a 30 minutos de exposición lumínica usando el dispositivo *PMA-Lite LED Photolysis* (Biotium Inc.). Con esta la fotoactivación se consiguió una reacción cruzada entre el ADN de las células no viables y el PMA. A continuación, esta suspensión fue centrifugada a 12.000 rpm durante 3 minutos, antes de proceder al proceso de aislamiento del ADN. Para controlar cualquier posible influencia de este proceso experimental sobre la viabilidad bacteriana, se realizó el mismo procedimiento (incubación a 4°C y exposición lumínica), pero sin la exposición a PMA, utilizando este último procedimiento como control negativo.

Posteriormente, el ADN bacteriano se aisló de todos los *biofilms* mediante la utilización del *kit* comercial *ATP Genomic DNA Mini Kit®* (ATP biotech. Taipei, Taiwán), para ello se siguieron las instrucciones proporcionadas por el fabricante y para detectar y cuantificar el ADN bacteriano se utilizó la técnica de qPCR mediante el empleo de sondas de hidrólisis 5'nucleasa. Para la amplificación mediante qPCR se siguió un protocolo previamente validado y optimizado por el grupo de

investigación ETEP (Etiología y Terapéutica de las Enfermedades Periodontales), utilizando cebadores y sondas con afinidad hacia el gen 16S rRNA [obtenidas a través de *Life Technologies Invitrogen* (Carlsbad, CA, EE. UU.)] (Sanchez, Marin, y cols. 2014). (Tabla 5).

Tabla 5 - Secuencias de los cebadores y sondas utilizados para la detección y cuantificación del ADN genómico de las bacterias involucradas en el desarrollo del *biofilm*. Tanto los cebadores como las sondas se han dirigido al gen 16S rRNA en todos los casos (Sanchez, Marin, y cols. 2014).

Bacteria	Secuencia (5' – 3')	Longitud (pb)
So		97
Avance	CAACGATACATAGCCGACCTGAG TCCATTGCCGAAGATTCC	
Reverso	6FAM-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA -BBQ	
Sonda		
Vp		66
Avance	TGCTAATACCGCATACGATCTAACC	
Reverso	GCTTATAAATAGAGGCCACCTTTCA 6FAM-	
Sonda	CTATCCTCGATGCCGA -TAMRA	
An		103
Avance	GGCTGCGATACCGTGAGG TCTGCGATTACTAGCGACTCC	
Reverso	6FAM- CCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAT-BBQ	
Sonda		
Pg		67
Avance	GCGCTCAACGTTGAGCC CACGAATTCCGCCTGC	
Reverso	6FAM-CACTGAACTCAAGCCCGGCAGTTTCAA-TAMRA	
Sonda		
Aa		80
Avance	GAACCTTAC CTACTCTTGACATCCGAA	
Reverso	TGCAGCACCTGTCTCAAAGC	
Sonda	6FAM-AGAACTCAGAGATGGGTTTGTGCCTTAGGG-TAMRA	
Fn		162
Avance	GGATTTATTGGGCGTAAAGC	
Reverso	GGCATTCTACAAATATCTACGAA	
Sonda	6FAM-CTCTACACTTGTAGTTCCG-TAMRA	
Leyenda: pb – pares de bases; So - <i>S. oralis</i> ; Vp - <i>V. parvula</i> ; An - <i>A. naeslundii</i> ; Aa – <i>A. actinomycetemcomitans</i> ; Fn - <i>F. nucleatum</i> ; Pg - <i>P. gingivalis</i> .		

La reacción se realizó en un volumen final de 10 μ L, formada por: 5 μ L de *Master Mix 2x* (LC 480 Probes Master; Roche), la concentración idónea de cebadores y sondas (900, 900 y 300 nM para *S. oralis*; 300, 300 y 300 nM para *A. naeslundii*; 750, 750 y 400 nM para *V. parvula*; 300, 300 y 200 nM para *A. actinomycetemcomitans*; 300, 300 y 300 nM para *P. gingivalis*; 600, 600 y 300 nM para *F. nucleatum*), y 2 μ L de ADN de las muestras del *biofilm*. El control negativo fue de 2 μ L de agua estéril ((Water PCR grade, Roche).

Las muestras se sometieron a un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min, seguido de 45 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 min. Los análisis se realizaron con un termociclador *LightCycler® 480 II thermocycler* (Roche). (Figura 16).



Figura 16 - Termociclador *LightCycler® 480 II thermocycler* (Roche). Laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología, Universidad Complutense de Madrid.

Las placas que se utilizaron fueron *FramStar 480* (4titude, The North Barn Damphurst Lane, Inglaterra) selladas con *qPCR Adhesive Clear Seals* (4titude). (Figura 17).

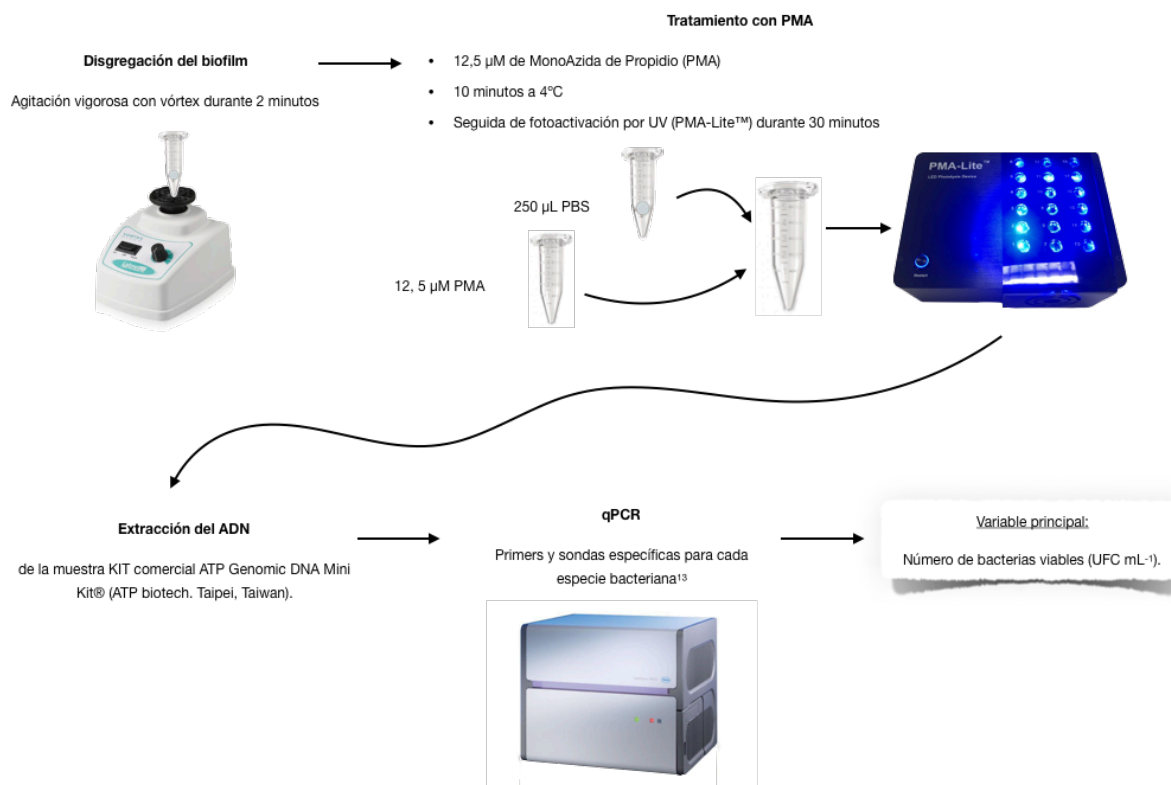


Figura 17 - Representación esquemática del procesamiento de muestras por qPCR.

Cada muestra de ADN fue analizada por duplicado. El valor del ciclo de cuantificación (Cq), anteriormente conocido como valor umbral del ciclo (Ct), describen los ciclos de la PCR en los cuales la fluorescencia sobrepasa al estado basal. Este valor se determinó mediante el empleo del *software* informático (LC 480 Software 1,5; Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Alemania).

La cuantificación del número de células vivas detectadas por qPCR se basó en curvas estándar. Para ello, se sometió 1 mL de cada una de las seis especies utilizadas en el estudio, a una concentración de 10^9 UFC/mL, al método de extracción de ADN anteriormente mencionado. Se realizaron diluciones seriadas del ADN de las distintas bacterias en agua estéril, con un rango de 10^9 - 10^0 UFC/mL. Las curvas estándar fueron construidas con los valores Cq generados en la qPCR frente al logaritmo (log) de UFC/mL. La correlación entre los valores de Cq y las UFC/mL fue generada automáticamente a través del *software* informático (LC 480 Software 1,5; Roche).

Todos los ensayos se desarrollaron con un rango de detección lineal

cuantitativa establecido por el rango de la pendiente de 3,3-3,7 ciclos/log, $r^2 > 0,997$ y un rango de eficiencia de 1,9-2,0.

4.5 Análisis del *biofilm* mediante CLSM

Los análisis con CLSM se llevaron a cabo en el Centro nacional de microscopía electrónica (ICTS, por sus siglas en inglés) (Universidad Complutense, Madrid, España). (Figura 18)

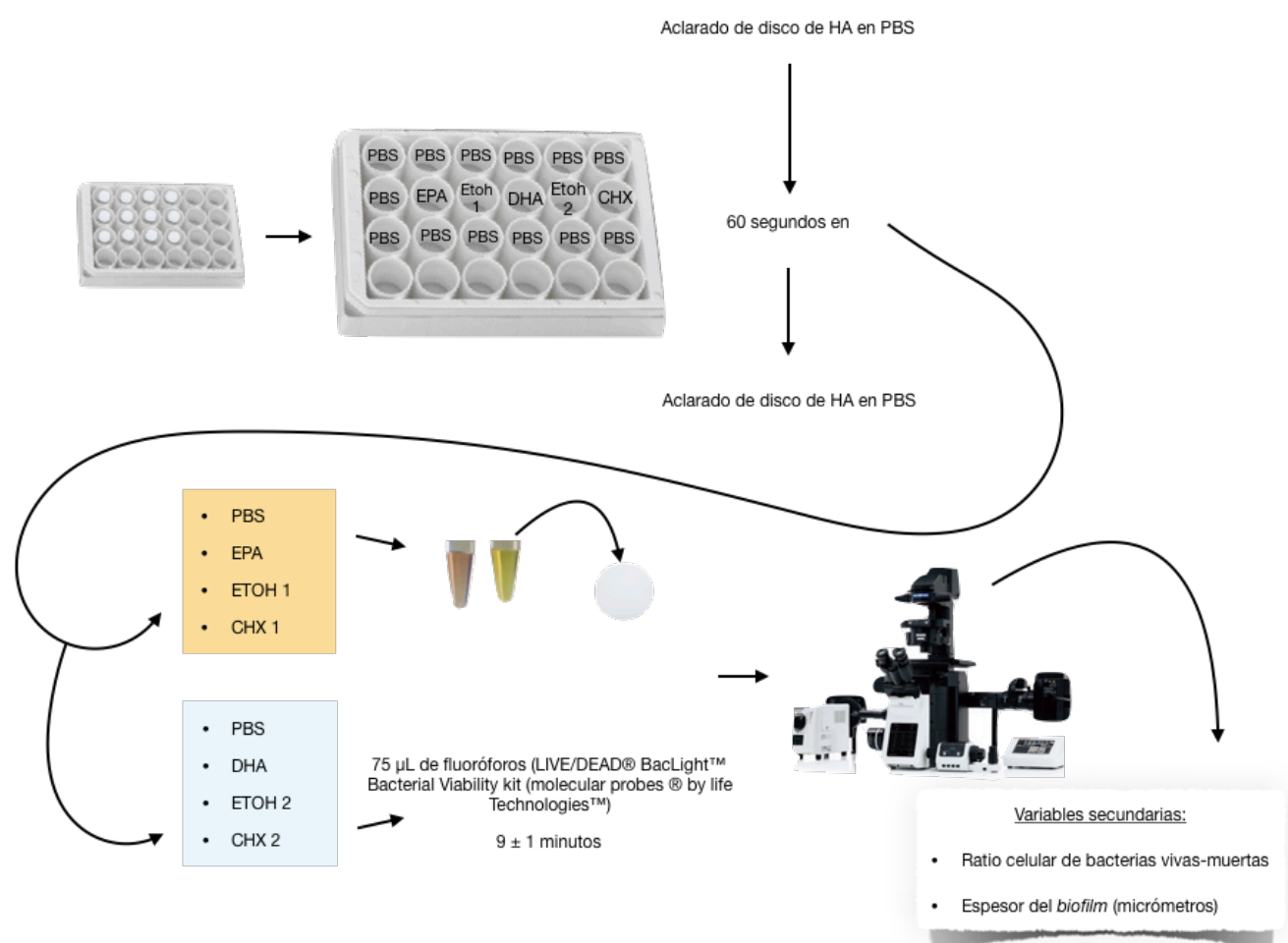


Figura 18 – Representación esquemática del análisis de muestras mediante CLSM.

Tras el tratamiento antimicrobiano y antes de la realización del análisis de CLSM, los discos de HA con los *biofilms* fueron lavados secuencialmente tres veces en 2 mL de PBS estéril (inmersión de 10 segundos por lavado), para eliminar cualquier posible resto de los extractos y de bacterias no adheridas.

La de microscopía confocal no invasiva de los *biofilms* totalmente hidratados se realizó mediante el microscopio Ix83 *Olympus* de fase fija acoplado a un sistema confocal *Olympus* FV1200 (*Olympus*, Shinjuku, Tokio, Japón) (Figura 19).



Figura 19 - Microscopio Ix83 *Olympus* (*Olympus*, Shinjuku, Tokio, Japón). ICTS (Universidad Complutense, Madrid, España).

Las muestras fueron teñidas con el kit *LIVE/DEAD[®] BacLightTM Bacterial Viability Kit solution* (Molecular Probes B. V., Leiden, Holanda) a temperatura ambiente. Se utilizó la proporción 1:1 de fluorocromo con un tiempo de tinción de 9 ± 1 minutos para obtener la señal óptima de fluorescencia a las longitudes de onda correspondientes (Syto9: 515-530 nm, ioduro de propidio (IP): >600 nm).

Para realizar las mediciones al menos tres localizaciones separadas y representativas fueron seleccionadas, en los discos de HA cubiertos de *biofilm* (tomando como base la presencia de columnas o torres de comunidades bacterianas, identificadas en el campo de visión confocal).

El software CLSM se programó para realizar una serie z de escaneados (xyz) de $1 \mu\text{m}$ de espesor (16 bits, 2048×2048 píxeles). Las imágenes se analizaron utilizando el software *Olympus[®]* (*Olympus*).

4.6 Análisis del *biofilm* mediante SEM

Los análisis con SEM se llevaron a cabo en el ICTS (Universidad Complutense, Madrid, España).

El primer paso fue lavar las muestras secuencialmente con 2 mL de PBS estéril para eliminar las bacterias que no adheridas al disco de HA, este proceso se repitió tres veces de forma consecutiva (10 segundos de inmersión por lavado). Tras esto, las muestras se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% (Panreac. Química, Barcelona, España) y de glutaraldehído al 2,5% (Panreac. Química) durante 4 horas a 4°C. A continuación, las muestras se volvieron a lavar con PBS y agua estéril (tiempo de inmersión por lavado de 10 min) y procedió a la deshidratación a través de una serie de soluciones graduadas de EtOH (30, 50, 70, 80, 90 y 100%; tiempo de inmersión de 10 minutos por cada serie).

Posteriormente, se llevó a cabo el secado de las muestras por puntos críticos, se recubrieron con oro por pulverización catódica y se analizaron mediante microscopía electrónica utilizando para ello el microscopio electrónico JSM 6400 (JSM 6400; JEOL, Tokio, Japón), con un detector de electrones retrodispersados y una resolución de imagen de 25 kV. (Figura 20).



Figura 20 - Microscopio electrónico JSM 6400 (JSM 6400; JEOL, Tokio, Japón). ICTS (Universidad Complutense, Madrid, España).

4.7 Análisis estadístico

La variable dependiente empleada en este estudio para valorar el efecto antimicrobiano de EPA y DHA de manera independiente, ha sido el número de bacterias viables presentes en el *biofilm*, expresado como UFC/mL (variable respuesta primaria). Esta variable ha sido evaluada para las bacterias totales e individualmente para cada especie bacteriana: *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, obteniendo estos datos por qPCR.

La variable exposición (independiente) empleada fue la exposición a uno de los ácidos grasos o a sus controles (categórica).

Para contrastar la normalidad de la distribución de los datos, estos fueron sometidos al test de *Shapiro-Wilk*, determinando que no todos los datos seguían una distribución normal. Pese a esto, el efecto de cada solución (extractos de EPA, DHA, PBS, EtOH y CHX 0,2%), el tiempo de exposición (60 segundos) (variables independientes) y su interacción con las variables dependientes (recuentos expresados como UFC/mL y proporción células vivas/células muertas), se evaluó mediante el test paramétrico ANOVA para más de dos muestras independientes (variables cuantitativas) -expresando los datos como medias \pm DE-, y las correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples.

La justificación para haber empleado este test paramétrico es que – pese a estar indicada la utilización de un test no paramétrico – al ser un estudio *in vitro* tienen más fuerza los datos proporcionados por el test ANOVA y, además, tras haber efectuado el test no paramétrico de *Kruskal Wallis*, se observó que no nos proporcionaba información adicional con respecto al ANOVA, encontrando en todos los casos diferencias estadísticamente significativas.

Por las razones anteriormente mencionadas, para el presente estudio decidimos basarnos en los resultados obtenidos a través de ANOVA, utilizando para ello medias y DE, pero incluyendo en un apéndice adicional los datos obtenidos a partir del test *Kruskal Wallis* como medianas e intervalos de confianza.

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con una

$p < 0,05$ y el análisis de los datos se hizo en el *software* informático (IBM SPSS Statistics 24,0; IBM Corporation, Armonk, NY, EE. UU.).

5 RESULTADOS

5.1 MIC y MBC de las especies bacterianas en planctónico frente a EPA y DHA

Para evaluar la capacidad antimicrobiana de los extractos de EPA y DHA de manera independiente frente a las especies bacterianas en estado planctónico, involucradas en el desarrollo de un modelo validado de *biofilm in vitro* (Sanchez y cols. 2011), se determinaron las MICs y MBCs de cada una de las especies bacterianas indicadas anteriormente. Para facilitar la interpretación de los datos, el valor de crecimiento fue obtenido cuando las bacterias se encontraban en la fase exponencial de la curva de crecimiento, de acuerdo con los requerimientos de cada cepa bacteriana (alcanzada tras 4 h de incubación en *S. oralis*, tras 12 h para *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* y tras 24 h para *V. parvula*, *A. naeslundii* y *P. gingivalis*).

Con respecto a las **MICs**:

- Las concentraciones bacteriostáticas medias de EPA fueron las siguientes: 50 $\mu\text{M/mL}$ para *S. oralis*, 100 $\mu\text{M/mL}$ para *A. naeslundii*, 50 μM para *V. parvula*, 100 μM para *F. nucleatum*, 25 μM para *P. gingivalis*, 25 μM para *A. actinomycetemcomitans*.
- Las concentraciones bacteriostáticas medias de DHA fueron: 50 $\mu\text{M/mL}$ para *S. oralis*, 50 $\mu\text{M/mL}$ para *A. naeslundii*, 50 μM para *V. parvula*, 100 μM para *F. nucleatum*, 25 μM para *P. gingivalis*, 25 μM para *A. actinomycetemcomitans*.

Con relación a las **MBCs**:

- Las medias de las concentraciones bactericidas medias de EPA fueron las siguientes: 100 $\mu\text{M/mL}$ para *S. oralis*, 100 $\mu\text{M/mL}$ para *A. naeslundii*, 100 μM para *V. parvula*, 100 μM para *F. nucleatum*, 50 μM para *P. gingivalis*, 100 μM para *A. actinomycetemcomitans*.
- Las concentraciones bactericidas medias de DHA fueron: 100 $\mu\text{M/mL}$ para *S. oralis*, 100 $\mu\text{M/mL}$ para *A. naeslundii*, 100 μM para *V. parvula*, 100 μM para *F. nucleatum*, 100 μM para *P. gingivalis*, 100 μM para *A. actinomycetemcomitans*.

De acuerdo con estos resultados, se observa que los extractos de ácidos grasos presentan actividad antimicrobiana frente a los patógenos periodontales involucrados en el modelo, mostrando las propiedades antimicrobianas más relevantes frente a los patógenos periodontales *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*.

5.2 Efecto antibacteriano en el modelo de *biofilm in vitro* del extracto de DHA

5.2.1 Análisis mediante la técnica de qPCR

El efecto antimicrobiano de los extractos de DHA (concentración de 100 µM/mL), comparado con el control negativo (PBS), con EtOH (debido a su posible actividad antimicrobiana), y con el control positivo (CHX 0,2%) en el recuento medio de bacterias viables incluidas en los *biofilms* de 72 h, se representan en la Tabla 6 y la representación en box plots de los resultados se puede ver en la figura 21.

Tras la exposición durante 60 segundos de las seis especies bacterianas - organizadas en *biofilm* y medidas como UFC/mL- a los extractos de DHA, se observaron reducciones significativas en los recuentos de bacterias viables de los colonizadores iniciales. Se puede apreciar una reducción significativa en los recuentos de bacterias viables de *S. oralis* después de 60 segundos ($p < 0,001$) en comparación con el control negativo (PBS), alcanzándose reducciones de hasta el 99,95% en las UFC/mL y de hasta tres órdenes de magnitud respecto al control negativo (Tabla 6; Figura 21). Además, se observaron reducciones significativas en la viabilidad bacteriana de *S. oralis* causadas por EtOH y CHX 0,2% (Tabla 6) frente al PBS, pese a que la reducción en órdenes de magnitud no fue tan marcada en estos casos respecto a PBS (reducción de un orden de magnitud con CHX 0,2% y de ningún orden con EtOH). El efecto de DHA versus PBS fue estadísticamente significativo ($p < 0,001$), pero su efecto no fue estadísticamente significativo versus EtOH ($p = 0,170$) y CHX 0,2% ($p = 1,000$);

Los extractos de DHA afectaron de manera significativa, dentro del *biofilm* a *A. naeslundii* (reducción del 99,82%) y *V. parvula* (reducción del 99,81%), tras 60 segundos de exposición ($p < 0,001$ en ambos casos), observando en ambas bacterias reducciones de tres órdenes de magnitud tras el tratamiento con DHA.

Produciéndose además reducciones significativas ($p < 0,001$) en los recuentos de bacterias viables de las dos especies bacterianas mencionadas frente a EtOH y a CHX 0,2% después de 60 segundos de exposición (Tabla 6); pero, al igual que ocurría en el caso de *S. oralis*, estas reducciones no fueron tan marcadas como las observadas con el tratamiento de DHA (reducción de un orden de magnitud con CHX 0,2% y de ninguno orden con EtOH). En ambos casos, el efecto de DHA versus PBS fue estadísticamente significativo ($p < 0,001$), así como su efecto versus EtOH ($p < 0,001$) -tanto para *A. naeslundii* como para *V. parvula*-. Pero ni en el caso de *A. naeslundii* ni en el de *V. parvula* el efecto de DHA versus CHX 0,2% fue estadísticamente significativo ($p = 1,000$ y $p = 0,160$, respectivamente).

Con respecto al colonizador secundario *F. nucleatum*, se observó un efecto muy relevante sobre las UFC/mL en el *biofilm* tras la exposición a 60 segundos de contacto con los extractos de DHA, en comparación con el control negativo (exposición a PBS), alcanzando una disminución del 99,92% en las UFC/mL, observando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Tabla 6; Figura 21) y de hasta tres órdenes de magnitud. Además, se observaron reducciones estadísticamente significativas en las UFC/mL después de 60 segundos de exposición a EtOH ($p = 0,004$), en comparación con el control negativo (exposición a PBS); pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas tras la exposición a la CHX 0,2% ($p = 0,789$) versus PBS; y, a diferencia de en las especies bacterianas anteriores, se observó la reducción de un orden de magnitud con EtOH y de ninguno con CHX 0,2%. Cabe destacar que para *F. nucleatum*, el efecto de DHA versus EtOH no fue estadísticamente significativo ($p = 0,445$), pero sí fue estadísticamente significativo en el caso de DHA versus CHX 0,2% ($p = 0,002$).

Con relación a los patógenos periodontales de colonización tardía, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, se observaron reducciones estadísticamente significativas en las UFC/mL después de 60 segundos de exposición a los extractos de DHA, a EtOH o a CHX 0,2% ($p < 0,001$ en los tres casos), en comparación con el control negativo (exposición a PBS); observando en ambas bacterias reducciones de hasta tres órdenes de magnitud tras el tratamiento con DHA, pero de un solo orden tras el tratamiento con EtOH o CHX 0,2%. Así mismo, se obtuvo una reducción del 99,92% de las UFC/mL para *P. gingivalis* y del 99,90% para *A.*

actinomycescomitans, tras 60 segundos de exposición a los extractos de DHA (Tabla 6; Figura 21). En el caso de *P. gingivalis* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=1,000$) al comparar la exposición a los extractos de DHA versus EtOH, pero sí en el caso de *A. actinomycescomitans* ($p=0,006$). Mientras que, ni en el caso de *P. gingivalis* ni en el de *A. actinomycescomitans* se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la exposición a DHA versus CHX al 0,2% ($p=1,000$ y $p=0,654$, respectivamente).

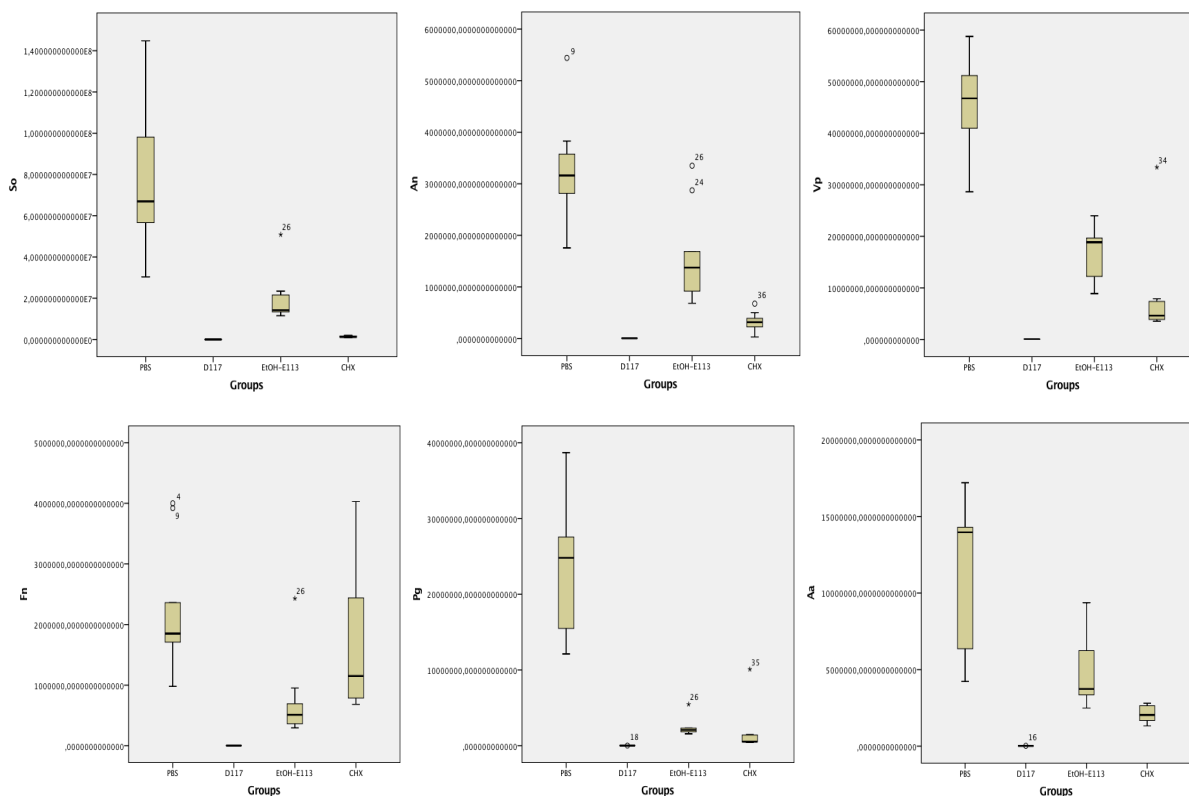


Figura 21 – Representación de los *box plot* sobre el efecto en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de las seis especies bacterianas (*So* – *Streptococcus oralis*; *An* – *Actinomyces naeslundii*; *Vp* – *Veillonella parvula*; *Aa* – *Aggregatibacter actinomycescomitans*; *Pg* – *Porphyromonas gingivalis*; *Fn* – *Fusobacterium nucleatum*) organizadas en *biofilm*, tras haber realizado el tratamiento con los extractos de DHA (100 μ M/mL) durante 60 segundos de exposición. Realizando en cada caso comparaciones respecto a los controles: PBS (control negativo), EtOH (solvente) y CHX 0,2% (control positivo).

Tabla 6 – Efecto antimicrobiano de los extractos de DHA en el numero medio de bacterias viables (expresado en UFC/mL) en el *biofilm* de crecimiento *in vitro*, cuantificadas mediante la técnica de qPCR.

*Los datos fueron expresados como medias con DE y fueron obtenidos a través del test ANOVA y las correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los datos obtenidos a través del test Kruskal Wallis expresados como medianas y grados de libertad se incluyen en el apéndice 8.1. PBS: Tampón fosfato salino; EtOH: Etanol.

	Tratamiento	N	Media	DE	p Global	Comparaciones	Diferencia de medias	IC 95%		p Post Hoc
								Límite inferior	Límite superior	
So	PBS	9	7,80 x 10 ⁷	3,46 x 10 ⁷	<0,001	PBS-DHA	7,80 x 10 ⁷	5,36 x 10 ⁷	1,02 x 10 ⁸	<0,001
	DHA		3,49 x 10 ⁴	4,53 x 10 ³		PBS-EtOH	5,81 x 10 ⁷	3,37 x 10 ⁷	8,25 x 10 ⁷	<0,001
	EtOH		1,99 x 10 ⁷	1,23 x 10 ⁷		PBS-CHX	7,66 x 10 ⁷	5,23 x 10 ⁷	1,01 x 10 ⁸	<0,001
	CHX		1,39 x 10 ⁶	3,81 x 10 ⁵		EtOH-DHA	1,99 x 10 ⁷	- 4,47 x 10 ⁶	4,43 x 10 ⁷	0,170
						CHX-DHA	1,35 x 10 ⁶	- 2,30 x 10 ⁷	2,57 x 10 ⁷	1,000
An	PBS	9	3,22 x 10 ⁶	1,04 x 10 ⁶	<0,001	EtOH-CHX	1,86 x 10 ⁷	- 5,82 x 10 ⁶	4,29 x 10 ⁷	0,240
	DHA		5,88 x 10 ³	1,51 x 10 ³		PBS-DHA	3,22 x 10 ⁶	2,28 x 10 ⁶	4,15 x 10 ⁶	<0,001
	EtOH		1,58 x 10 ⁶	9,42 x 10 ⁵		PBS-EtOH	1,64 x 10 ⁶	7,05 x 10 ⁵	2,58 x 10 ⁶	<0,001
	CHX		3,23 x 10 ⁵	1,88 x 10 ⁵		PBS-CHX	2,90 x 10 ⁶	1,96 x 10 ⁶	3,84 x 10 ⁶	<0,001
						EtOH-DHA	1,57 x 10 ⁶	6,31 x 10 ⁵	2,51 x 10 ⁶	<0,001
Vp	PBS	9	4,56 x 10 ⁷	9,86 x 10 ⁶	<0,001	CHX-DHA	3,17 x 10 ⁵	- 6,23 x 10 ⁵	1,26 x 10 ⁶	1,000
	DHA		8,83 x 10 ⁴	2,60 x 10 ⁴		EtOH-CHX	1,25 x 10 ⁶	3,14 x 10 ⁵	2,19 x 10 ⁶	0,004
	EtOH		1,68 x 10 ⁷	5,40 x 10 ⁶		PBS-DHA	4,55 x 10 ⁷	3,57 x 10 ⁷	5,53 x 10 ⁷	<0,001
	CHX		8,18 x 10 ⁶	9,59 x 10 ⁶		PBS-EtOH	2,88 x 10 ⁷	1,90 x 10 ⁷	3,86 x 10 ⁷	<0,001
						PBS-CHX	3,74 x 10 ⁷	2,76 x 10 ⁷	4,72 x 10 ⁷	<0,001
Fn	PBS	9	2,24 x 10 ⁶	1,04 x 10 ⁶	<0,001	EtOH-DHA	1,67 x 10 ⁷	6,89 x 10 ⁶	2,65 x 10 ⁷	<0,001
	DHA		2,01 x 10 ³	8,68 x 10 ²		CHX-DHA	8,09 x 10 ⁶	- 1,70 x 10 ⁶	1,79 x 10 ⁷	0,160
	EtOH		7,36 x 10 ⁵	6,70 x 10 ⁵		EtOH-CHX	8,59 x 10 ⁶	- 1,21 x 10 ⁶	1,84 x 10 ⁷	0,115
	CHX		1,62 x 10 ⁶	1,15 x 10 ⁶		PBS-DHA	2,24 x 10 ⁶	1,12 x 10 ⁶	3,36 x 10 ⁶	<0,001
						PBS-EtOH	1,50 x 10 ⁶	3,86 x 10 ⁵	2,62 x 10 ⁶	0,004
Pg	PBS	9	2,32 x 10 ⁷	8,31 x 10 ⁶	<0,001	PBS-CHX	6,15 x 10 ⁵	- 5,03 x 10 ⁵	1,73 x 10 ⁶	0,789
	DHA		1,77 x 10 ⁴	2,71 x 10 ³		EtOH-DHA	7,34 x 10 ⁵	- 3,84 x 10 ⁵	1,85 x 10 ⁶	0,445
	EtOH		2,37 x 10 ⁶	1,20 x 10 ⁶		CHX-DHA	1,62 x 10 ⁶	5,05 x 10 ⁵	2,74 x 10 ⁶	0,002
	CHX		1,82 x 10 ⁶	3,13 x 10 ⁶		EtOH-CHX	- 8,89 x 10 ⁵	- 3,84 x 10 ⁵	1,85 x 10 ⁶	0,194
						PBS-DHA	2,32 x 10 ⁷	1,73 x 10 ⁷	2,92 x 10 ⁷	<0,001
Aa	PBS	9	1,14 x 10 ⁷	4,84 x 10 ⁶	<0,001	PBS-EtOH	2,09 x 10 ⁷	1,49 x 10 ⁷	2,68 x 10 ⁷	<0,001
	DHA		1,12 x 10 ⁴	4,71 x 10 ³		PBS-CHX	2,14 x 10 ⁷	1,55 x 10 ⁷	2,73 x 10 ⁷	<0,001
	EtOH		4,62 x 10 ⁶	2,25 x 10 ⁶		EtOH-DHA	2,36 x 10 ⁶	- 3,58 x 10 ⁶	8,29 x 10 ⁶	1,000
	CHX		2,10 x 10 ⁶	5,64 x 10 ⁵		CHX-DHA	1,81 x 10 ⁶	- 4,13 x 10 ⁶	7,74 x 10 ⁶	1,000
						EtOH-CHX	5,50 x 10 ⁵	- 5,39 x 10 ⁶	6,49 x 10 ⁶	1,000
	PBS	9	1,14 x 10 ⁷	4,84 x 10 ⁶	<0,001	PBS-DHA	1,14 x 10 ⁷	7,81 x 10 ⁶	1,49 x 10 ⁷	<0,001
	DHA		1,12 x 10 ⁴	4,71 x 10 ³		PBS-EtOH	6,76 x 10 ⁶	3,20 x 10 ⁶	1,03 x 10 ⁷	<0,001
	EtOH		4,62 x 10 ⁶	2,25 x 10 ⁶		PBS-CHX	9,28 x 10 ⁶	5,73 x 10 ⁶	1,28 x 10 ⁷	<0,001
	CHX		2,10 x 10 ⁶	5,64 x 10 ⁵		EtOH-DHA	4,61 x 10 ⁶	1,06 x 10 ⁶	8,17 x 10 ⁶	0,006
						CHX-DHA	2,08 x 10 ⁶	- 1,47 x 10 ⁶	5,64 x 10 ⁶	0,654
						EtOH-CHX	2,53 x 10 ⁶	- 1,03 x 10 ⁶	6,08 x 10 ⁶	0,325

5.2.2. Análisis mediante Microscopía Láser Confocal (CLSM)

El análisis por CLSM mostró cómo, después de 72 h de incubación, los *biofilms* control cubrían toda la superficie de los discos de HA, formando una capa discontinua de células, entre las que se pueden distinguir las estructuras características de los *biofilms* con células agrupadas en “torres” multi-especies (Figura 22 A). Mientras que, se pudo observar que después de 60 segundos de exposición a los extractos de DHA (Figura 22 C), la reducción en la viabilidad celular fue muy pronunciada cuando estos extractos se aplicaron; observando también una reducción -aunque ligera- en los *biofilm* expuestos a la solución de EtOH (Figura 22 B) y a la CHX al 0,2% (Figura 22 D) en relación con los *biofilms* control (Figura 22 A).

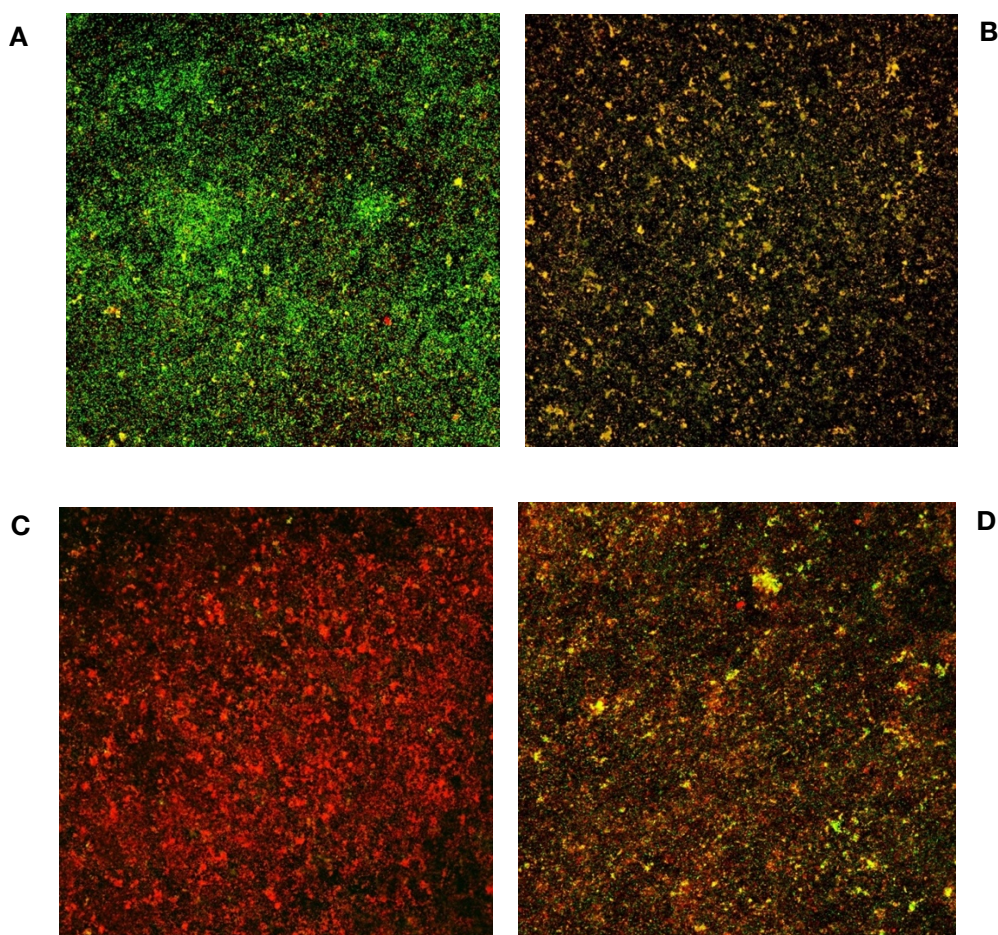


Figura 22 – Máxima proyección de imágenes obtenidas por microscopía de barrido láser confocal (CLSM) de los *biofilms* de 72 h, donde se observa el crecimiento de esos *biofilms* sobre las superficies de los discos de HA, teñidas con *LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit*, tras 60 segundos de exposición: (A) al control negativo (PBS); (B) a la solución de EtOH; (C) a los extractos de DHA (concentración de 100 μ M/mL) y (D) a la CHX al 0,2%.

5.2.3. Análisis mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se observó la formación del *biofilm* a las 72 h en discos de HA tras el tratamiento con PBS, DHA, EtOH o CHX al 0,2% (Figura 23).

En los discos de HA tratados con PBS (Figura 23 A), utilizados como control de la formación del *biofilm in vitro*, se observó la presencia de bacterias sobre la superficie, bien como células individuales formando cadenas -características del género *Streptococcus*, pero también de *Aggregatibacter*-, o como agregados multicelulares, mostrando una organización estructural basada principalmente en la co-agregación célula a célula. También pudieron reconocerse en el *biofilm* los bacilos fusiformes característicos del género *F. nucleatum*, agrupados en una red tridimensional que parece conformar la estructura de la comunidad sésil.

El análisis de los discos tratados con DHA (Figura 23 B) permitió observar diferencias relevantes -con respecto a los discos control-, observándose menor densidad de bacterias en la superficie, y de ellas, una alta proporción con daño a nivel estructural. Mientras que los discos tratados con EtOH (Figura 23 C) o CHX 0,2% (Figura 23 D) -aunque sí mostraron una reducción ligera en la densidad bacteriana- no fue tan marcada como la observada en el caso de los discos tratados con DHA (Figura 23 B).

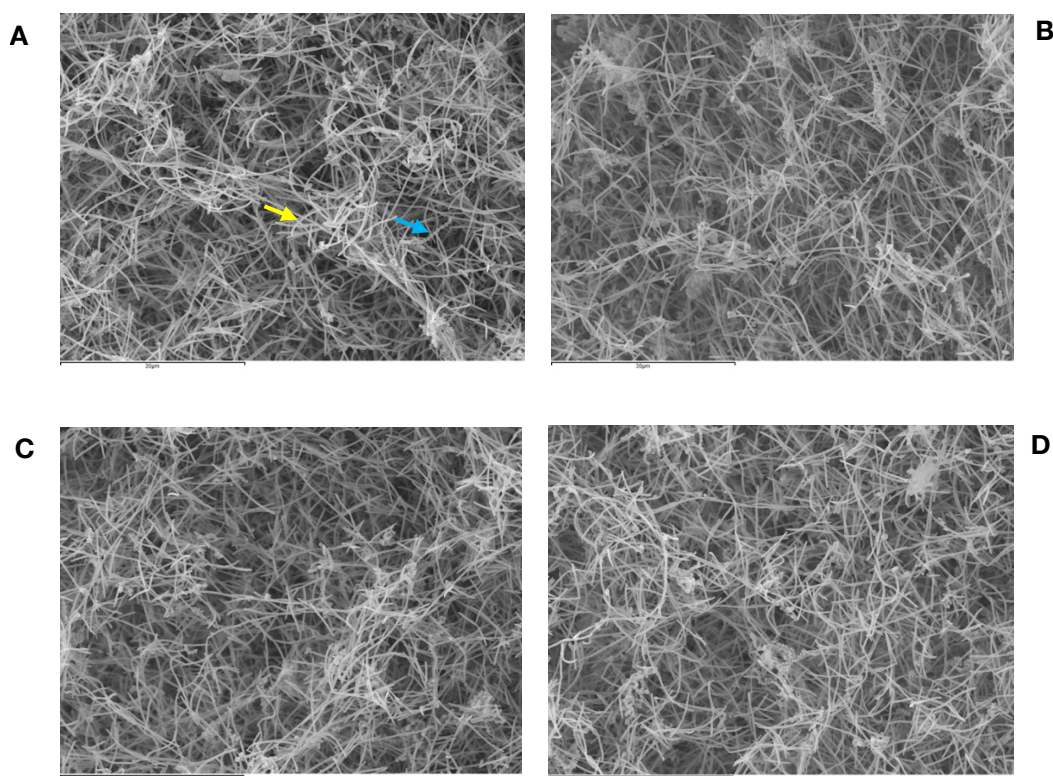


Figura 23 – Microscopía electrónica de barrido (SEM) de *biofilms* de 72 horas de evolución en discos de hidroxiapatita (HA) tratados con el control negativo: PBS (A), con DHA (B), con EtOH (C) o con el control positivo: CHX 0,2% (D). Se pudo observar una población bacteriana densa en los discos de HA tratados con PBS (A), formando capas discontinuas de bacterias adheridas a los discos. Mientras que, los *biofilms* de los discos tratados con DHA (B), se pudo observar una menor densidad de células distribuidas por la superficie del disco e incluso algunas de ellas manifestando daño estructural. Así mismo, en los discos tratados con EtOH (C) o CHX 0,2% (D), también se pudo observar una reducción -aunque más ligera que en los discos tratados con DHA (B)- en la densidad bacteriana presente en la superficie del disco. Pueden identificarse cadenas de *Aggregatibacter* y/o *Streptococcus* (Flecha azul) y bacilos fusiformes del género *F. nucleatum* (Flecha amarilla). Aumento (A-D): 1.500X.

5.3. Efecto antibacteriano en el modelo de *biofilm in vitro* del extracto de EPA

5.3.1. Análisis mediante la técnica de qPCR

El efecto antimicrobiano de los extractos de EPA (concentración de 100 $\mu\text{M/mL}$), comparado con el control negativo (PBS), con EtOH (debido a su posible actividad antimicrobiana), y con el control positivo (CHX 0,2%) en el recuento medio de bacterias viables incluidas en los *biofilms* de 72 h, se representan en la Tabla 7 y la representación en box plots de los resultados se puede ver en la figura 24.

Tras la exposición durante 60 segundos de las seis especies bacterianas - organizadas en *biofilm* y medidas como UFC/mL - a los extractos de EPA, se observaron reducciones significativas en los recuentos de bacterias viables de los colonizadores iniciales. Se apreció una reducción significativa en los recuentos de bacterias viables de *S. oralis* después de 60 segundos ($p < 0,001$) en comparación con el control negativo (PBS), alcanzándose reducciones de hasta el 97,61% en las UFC/mL (Tabla 7; Figura 24). Además, se observaron reducciones significativas en la viabilidad bacteriana de *S. oralis* causadas por EtOH y CHX 0,2% (Tabla 7) frente al PBS. El efecto de EPA versus PBS fue estadísticamente significativo ($p < 0,001$), pero su efecto no fue estadísticamente significativo versus EtOH ($p = 0,144$) y CHX 0,2% ($p = 1,000$).

Los extractos de EPA afectaron de manera significativa, dentro del *biofilm* a *A. naeslundii* (reducción del 98,36%) y *V. parvula* (reducción del 95,43%), tras 60 segundos de exposición ($p < 0,001$ en ambos casos), observando también reducciones de hasta dos órdenes de magnitud en el caso de *A. naeslundii*. Produciéndose además reducciones significativas ($p < 0,001$) en los recuentos de bacterias viables de las dos especies bacterianas mencionadas frente a EtOH y a CHX 0,2% después de 60 segundos de exposición (Tabla 7), pero solo de un orden de magnitud en ambas bacterias y frente a ambas sustancias. Concretamente en el caso de *A. naeslundii* el efecto de EPA versus EtOH no fue estadísticamente significativo ($p = 0,768$), pero sí lo fue en el caso de *V. parvula* ($p = 0,003$). Mientras que, el efecto de EPA versus CHX 0,2% no fue estadísticamente significativo frente a ninguna de las citadas bacterias ($p = 1,000$ y $p = 0,160$, respectivamente).

Con respecto al colonizador secundario *F. nucleatum*, se observó un efecto relevante sobre las UFC/mL en el *biofilm* tras la exposición a 60 segundos de contacto con los extractos de EPA -en comparación con el control negativo (exposición a PBS)-, alcanzando una disminución del 98,67% en las UFC/mL, observando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Tabla 7; Figura 24) y de hasta dos órdenes de magnitud. También se observaron reducciones estadísticamente significativas en las UFC/mL después de 60 segundos de exposición al EtOH ($p < 0,001$), en comparación con el control negativo; así como tras la exposición a CHX 0,2% ($p = 0,018$), pero produciéndose únicamente la reducción de un orden de magnitud en el caso de EtOH y de ninguno con la CHX 0,2%. Además, para *F. nucleatum*, el efecto de EPA versus EtOH no fue estadísticamente significativo ($p = 0,205$), pero sí lo fue en el caso de EPA versus CHX 0,2% ($p = 0,001$).

Con relación a los patógenos periodontales de colonización tardía, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, se observaron reducciones estadísticamente significativas en las UFC/mL después de 60 segundos de exposición a los extractos de EPA, a EtOH o a CHX 0,2% ($p < 0,001$ en los tres casos), en comparación con el control negativo (exposición a PBS). Además, se obtuvo una reducción del 97,52% de las UFC/mL para *P. gingivalis* y del 91,36% para *A. actinomycetemcomitans*, tras 60 segundos de exposición a los extractos de EPA (Tabla 7; Figura 24). Observando también en *P. gingivalis* la reducción de dos órdenes de magnitud con EPA y de uno con EtOH o CHX, mientras que en *A. actinomycetemcomitans* se produjo la reducción de un orden de magnitud con EPA y de ninguno con EtOH o CHX. Así mismo, en el caso *P. gingivalis* se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto al comparar la exposición a los extractos de EPA versus EtOH ($p = 0,002$) como al comparar el efecto de EPA versus CHX 0,2% ($p = 0,014$). Mientras que, en el caso de *A. actinomycetemcomitans* no se encontraron diferencias, ni al comparar la exposición a EPA versus EtOH ($p = 0,676$) ni con CHX 0,2% ($p = 0,423$).

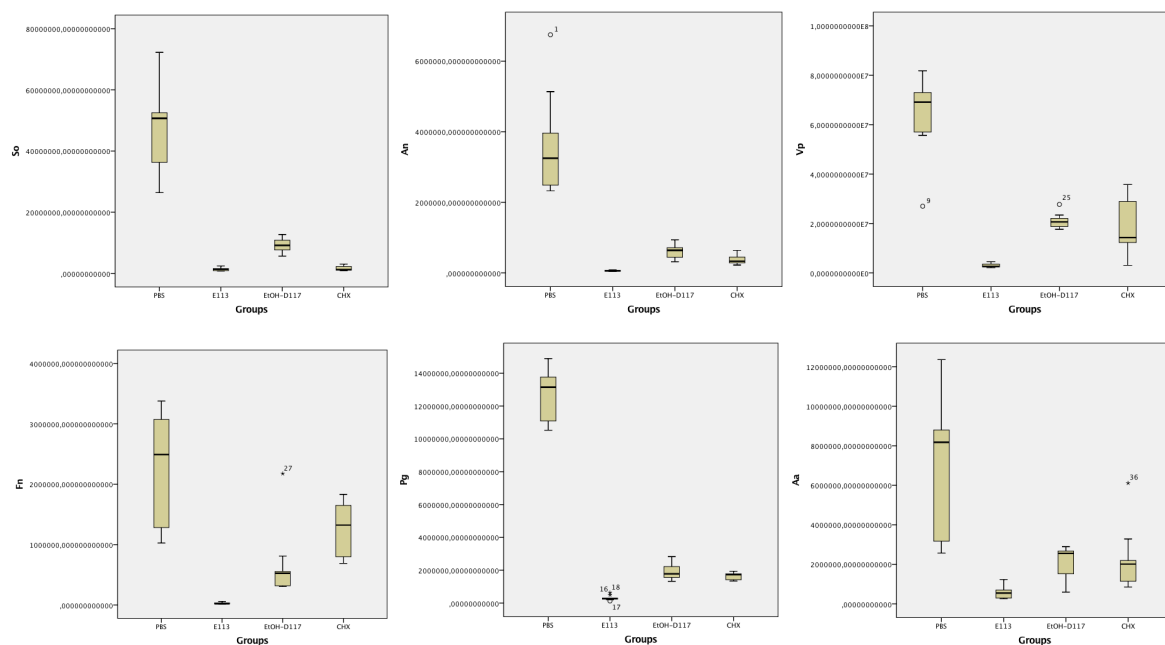


Figura 24 – Representación de los *box plot* sobre el efecto en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de las seis especies bacterianas (*So* – *Streptococcus oralis*; *An* – *Actinomices naeslundii*; *Vp* – *Veillonella parvula*; *Aa* – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Pg* – *Porphyromonas gingivalis*; *Fn* – *Fusobacterium nucleatum*) organizadas en *biofilm*, tras haber realizado el tratamiento con los extractos de EPA (100 μ M/mL) durante 60 segundos de exposición. Realizando en cada caso comparaciones respecto a los controles: PBS (control negativo), EtOH (solvente) y CHX 0,2% (control positivo).

Tabla 7 - Efecto antimicrobiano de los extractos de EPA en el numero medio de bacterias viables (expresado en UFC/mL) en el *biofilm* de crecimiento *in vitro*, cuantificadas mediante la técnica de qPCR.

*Los datos fueron expresados como medias con DE y fueron obtenidos a través del test ANOVA y las correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los datos obtenidos a través del test Kruskal Wallis expresados como medianas y grados de libertad se incluyen en el apéndice 8.1. PBS: Tampón fosfato salino; EtOH: Etanol.

	Tratamiento	N	Media	DE	p Global	Comparaciones	Diferencia de medias	IC 95%		p Post Hoc
								Límite inferior	Límite superior	
So	PBS	9	4,71 x 10 ⁷	1,38 x 10 ⁷	<0,001	PBS-EPA	4,57 x 10 ⁷	3,64 x 10 ⁷	5,50 x 10 ⁷	<0,001
	EPA		1,34 x 10 ⁶	5,12 x 10 ⁵		PBS-EtOH	3,79 x 10 ⁷	2,86 x 10 ⁷	4,72 x 10 ⁷	<0,001
	EtOH		9,17 x 10 ⁶	2,46 x 10 ⁶		PBS-CHX	4,54 x 10 ⁷	3,61 x 10 ⁷	5,47 x 10 ⁷	<0,001
	CHX		1,64 x 10 ⁶	7,58 x 10 ⁵		EtOH-EPA	7,83 x 10 ⁶	- 1,47 x 10 ⁶	1,71 x 10 ⁷	0,144
						CHX-EPA	2,96 x 10 ⁵	- 9,00 x 10 ⁶	9,59 x 10 ⁶	1,000
An	PBS	9	3,63 x 10 ⁶	1,47 x 10 ⁶	<0,001	EtOH-CHX	7,53 x 10 ⁶	- 1,76 x 10 ⁶	1,68 x 10 ⁷	0,177
	EPA		5,98 x 10 ⁴	1,82 x 10 ⁴		PBS-EPA	3,57 x 10 ⁶	2,59 x 10 ⁶	4,56 x 10 ⁶	<0,001
	EtOH		6,08 x 10 ⁵	1,91 x 10 ⁵		PBS-EtOH	3,02 x 10 ⁶	2,04 x 10 ⁶	4,01 x 10 ⁶	<0,001
	CHX		3,66 x 10 ⁵	1,30 x 10 ⁵		PBS-CHX	3,27 x 10 ⁶	2,28 x 10 ⁶	4,25 x 10 ⁶	<0,001
						EtOH-EPA	5,48 x 10 ⁵	- 4,39 x 10 ⁵	1,54 x 10 ⁶	0,768
Vp	PBS	9	6,43 x 10 ⁷	1,66 x 10 ⁷	<0,001	CHX-EPA	3,06 x 10 ⁵	- 6,81 x 10 ⁵	1,29 x 10 ⁶	1,000
	EPA		2,94 x 10 ⁶	8,30 x 10 ⁵		EtOH-CHX	2,42 x 10 ⁵	- 7,45 x 10 ⁵	1,23 x 10 ⁶	1,000
	EtOH		2,10 x 10 ⁷	3,14 x 10 ⁶		PBS-EPA	6,14 x 10 ⁷	4,81 x 10 ⁷	7,47 x 10 ⁷	<0,001
	CHX		1,80 x 10 ⁷	1,08 x 10 ⁷		PBS-EtOH	4,33 x 10 ⁷	3,00 x 10 ⁷	5,66 x 10 ⁷	<0,001
						PBS-CHX	4,63 x 10 ⁷	3,30 x 10 ⁷	5,96 x 10 ⁷	<0,001
Fn	PBS	9	2,16 x 10 ⁶	9,67 x 10 ⁵	<0,001	EtOH-EPA	1,81 x 10 ⁷	4,82 x 10 ⁶	3,14 x 10 ⁷	0,003
	EPA		2,88 x 10 ⁴	1,45 x 10 ⁴		CHX-EPA	1,51 x 10 ⁷	1,81 x 10 ⁶	2,84 x 10 ⁷	0,019
	EtOH		6,66 x 10 ⁵	5,88 x 10 ⁵		EtOH-CHX	3,00 x 10 ⁶	- 1,03 x 10 ⁷	1,63 x 10 ⁷	1,000
	CHX		1,24 x 10 ⁶	4,58 x 10 ⁵		PBS-EPA	2,13 x 10 ⁶	1,32 x 10 ⁶	2,94 x 10 ⁶	<0,001
						PBS-EtOH	1,50 x 10 ⁶	6,88 x 10 ⁵	2,31 x 10 ⁶	<0,001
Pg	PBS	9	1,27 x 10 ⁷	1,60 x 10 ⁶	<0,001	PBS-CHX	9,27 x 10 ⁵	1,18 x 10 ⁵	1,74 x 10 ⁶	0,018
	EPA		3,16 x 10 ⁵	1,55 x 10 ⁵		EtOH-EPA	6,37 x 10 ⁵	- 1,72 x 10 ⁵	1,45 x 10 ⁶	0,205
	EtOH		1,92 x 10 ⁶	5,04 x 10 ⁵		CHX-EPA	1,21 x 10 ⁶	3,98 x 10 ⁵	2,02 x 10 ⁶	0,001
	CHX		1,63 x 10 ⁶	2,18 x 10 ⁵		EtOH-CHX	- 5,70 x 10 ⁵	- 1,38 x 10 ⁶	2,39 x 10 ⁵	0,336
						PBS-EPA	1,23 x 10 ⁷	1,12 x 10 ⁷	1,35 x 10 ⁷	<0,001
Aa	PBS	9	6,84 x 10 ⁶	3,40 x 10 ⁶	<0,001	PBS-EtOH	1,07 x 10 ⁷	9,61 x 10 ⁶	1,19 x 10 ⁷	<0,001
	EPA		5,91 x 10 ⁵	3,18 x 10 ⁵		PBS-CHX	1,10 x 10 ⁷	9,90 x 10 ⁶	1,21 x 10 ⁷	<0,001
	EtOH		2,07 x 10 ⁶	7,91 x 10 ⁵		EtOH-EPA	1,60 x 10 ⁶	4,77 x 10 ⁵	2,73 x 10 ⁶	0,002
	CHX		2,29 x 10 ⁶	1,62 x 10 ⁶		CHX-EPA	1,32 x 10 ⁶	1,93 x 10 ⁵	2,44 x 10 ⁶	0,014
						EtOH-CHX	2,84 x 10 ⁵	- 8,41 x 10 ⁵	1,41 x 10 ⁶	1,000
	PBS	9	6,84 x 10 ⁶	3,40 x 10 ⁶	<0,001	PBS-EPA	6,25 x 10 ⁶	3,70 x 10 ⁶	8,81 x 10 ⁶	<0,001
	EPA		5,91 x 10 ⁵	3,18 x 10 ⁵		PBS-EtOH	4,77 x 10 ⁶	2,21 x 10 ⁶	7,33 x 10 ⁶	<0,001
	EtOH		2,07 x 10 ⁶	7,91 x 10 ⁵		PBS-CHX	4,55 x 10 ⁶	2,00 x 10 ⁶	7,11 x 10 ⁶	<0,001
	CHX		2,29 x 10 ⁶	1,62 x 10 ⁶		EtOH-EPA	1,48 x 10 ⁶	- 1,07 x 10 ⁶	4,04 x 10 ⁶	0,676
						CHX-EPA	1,70 x 10 ⁶	- 8,55 x 10 ⁵	4,26 x 10 ⁶	0,423
	PBS	9	6,84 x 10 ⁶	3,40 x 10 ⁶	<0,001	EtOH-CHX	- 2,18 x 10 ⁵	- 2,77 x 10 ⁶	2,34 x 10 ⁶	1,000
	EPA		5,91 x 10 ⁵	3,18 x 10 ⁵						
	EtOH		2,07 x 10 ⁶	7,91 x 10 ⁵						
	CHX		2,29 x 10 ⁶	1,62 x 10 ⁶						

5.3.2. Análisis mediante Microscopía Láser Confocal (CLSM)

El análisis por CLSM mostró cómo, después de 72 h de incubación, los *biofilms* control cubrían toda la superficie de los discos de HA, formando una capa discontinua de células, entre las que se pueden distinguir las estructuras características de los *biofilms* con células agrupadas en “torres” multi-especies (Figura 25 A). Mientras que, se pudo observar que después de 60 segundos de exposición a los extractos de EPA (Figura 25 C), la reducción en la viabilidad celular fue muy pronunciada; observando también una -ligera- reducción en los *biofilm* expuestos a la solución de EtOH (Figura 25 B) y a la CHX 0,2% (Figura 25 D) en relación con los *biofilms* control (Figura 25 A).

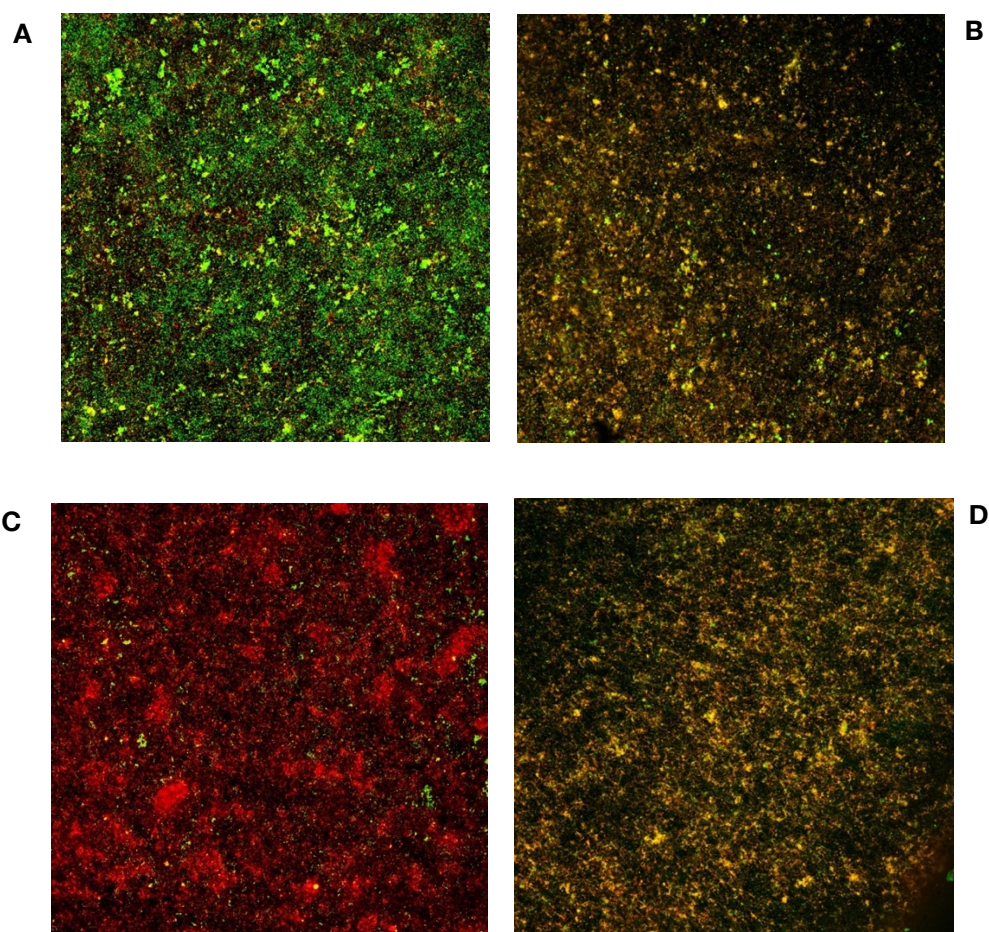


Figura 25 – Máxima proyección de imágenes obtenidas por microscopía de barrido láser confocal (CLSM) de los *biofilms* de 72 h, donde se observa el crecimiento de esos *biofilms* sobre las superficies de los discos de HA, teñidas con *LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit*, tras 60 segundos de exposición: (A) al control negativo (PBS); (B) a la solución de EtOH; (C) a los extractos de EPA (concentración de 100 μ M/mL) y (D) a la CHX al 0,2%.

5.3.3. Análisis mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se observó la formación del *biofilm* a las 72 h en discos de HA tras el tratamiento con PBS, EPA, EtOH o CHX al 0,2% (Figura 26).

En los discos de HA tratados con PBS (Figura 26 A), utilizados como control de la formación del *biofilm in vitro*, se observó la presencia de bacterias sobre la superficie, bien como células individuales formando cadenas -características del género *Streptococcus*, pero también de *Aggregatibacter*-, o como agregados multicelulares, mostrando una organización estructural basada principalmente en la co-agregación célula a célula. También pudieron reconocerse en el *biofilm* los bacilos fusiformes característicos del género *F. nucleatum*, agrupados en una red tridimensional que parece conformar la estructura de la comunidad sésil.

El análisis de los discos tratados con EPA (Figura 26 B) permitió observar diferencias relevantes -con respecto a los discos control-, observándose menor densidad de bacterias en la superficie, y de ellas, una alta proporción con daño a nivel estructural. Mientras que los discos tratados con EtOH (Figura 26 C) o CHX 0,2% (Figura 26 D) -aunque sí mostraron una reducción ligera en la densidad bacteriana- no fue tan marcada como la observada en el caso de los discos tratados con EPA (Figura 26 B).

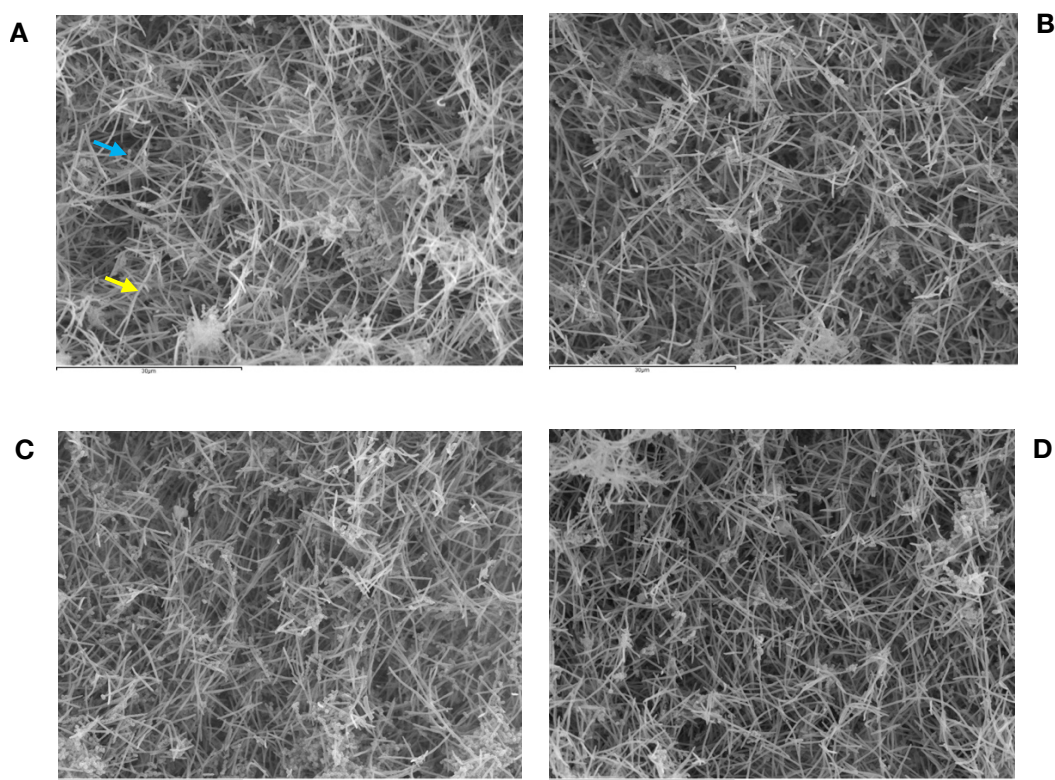


Figura 26 – Microscopía electrónica de barrido (SEM) de *biofilms* de 72 horas de evolución en discos de hidroxiapatita (HA) tratados con el control negativo: PBS (A), con EPA (B), con EtOH (C) o con el control positivo: CHX 0,2% (D). Se pudo observar una población bacteriana densa en los discos de HA tratados con PBS (A), formando capas discontinuas de bacterias adheridas a los discos. Mientras que, los *biofilms* de los discos tratados con EPA (B), se pudo observar una menor densidad de células distribuidas por la superficie del disco e incluso algunas de ellas manifestando daño estructural. Así mismo, en los discos tratados con EtOH (C) o CHX 0,2% (D), también se pudo observar una reducción -aunque más ligera que en los discos tratados con EPA (B)- en la densidad bacteriana presente en la superficie del disco. Pueden identificarse cadenas de *Aggregatibacter* y/o *Streptococcus* (Flecha azul) y bacilos fusiformes del género *F. nucleatum* (Flecha amarilla). Aumento (A-D): 1.500X.

6. DISCUSIÓN

La información que aporta este estudio es de gran relevancia de cara al manejo de las enfermedades periodontales, al proporcionar evidencia sobre el éxito que tienen -en mayor o menor medida- los extractos de EPA y DHA a la hora de reducir la carga bacteriana total y la viabilidad celular, tanto en las bacterias en estado plantónico como en estado de *biofilm*. Demostrando además que los patógenos periodontales -*S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*- son susceptibles a la acción de estos extractos.

Existe amplia evidencia sobre la **etiología bacteriana** de las enfermedades periodontales, y en concreto la periodontitis, así como sobre el hecho de que la presencia de bacterias periodonto patógenas específicas tiene un papel fundamental en el desarrollo de esta patología (Papapanou, Neiderud, Papadimitriou, Sandros, y Dahlen, 2000; Socransky y Haffajee, 2005; Socransky y cols. 1998). Por esta razón, el objetivo principal del tratamiento periodontal es la eliminación de estas bacterias periodonto patógenas, ya que la no eliminación de estas tras el tratamiento está íntimamente relacionada con la recidiva y progresión de la periodontitis (Haffajee y Socransky, 1994; Haffajee y cols. 2006; Listgarten, 1988; Rams y Slots, 1996).

Pese a esto, el **tratamiento periodontal** mecánico también tiene **limitaciones**, entre ellas figuran que la eliminación de las bacterias periodonto patógenas -tanto bacterias anaerobias estrictas como *P. gingivalis* y *F. nucleatum* (Mombelli y cols. 2000) o en anaerobias facultativas como *A. actinomycetemcomitans* (Christersson, Slots, Rosling, y Genco, 1985; Kornman y Robertson, 1985; Mombelli y cols. 1994a; Slots y Rosling, 1983)- no siempre es posible. En ocasiones, para solventar esta limitación, nos vemos obligadas a utilizar coadyuvantes del tratamiento mecánico periodontal como son los productos antimicrobianos y antibióticos, que pese a poder presentar gran eficacia (Herrera, Alonso, y cols. 2008; Herrera, Matesanz, Bascones-Martinez, y Sanz, 2012), también presentan grandes limitaciones, entre ellas los efectos adversos que es posible que produzcan (Serrano y cols. 2015).

En relación con estos efectos adversos mencionados, y debido al incremento de las resistencias antibióticas surge la necesidad de buscar **productos**

coadyuvantes alternativos que no supongan una amenaza para la salud pública a nivel mundial y que, además de ser efectivos frente a los patógenos embebidos en el *biofilm*, sean seguros (Projan y Youngman, 2002).

Cabe destacar que en varios estudios como en el Huang and Ebersole (2010), se ha demostrado que los **extractos de LCn3PUFAs** y, concretamente, EPA y DHA, podrían poseer relevantes efectos antisépticos frente a determinadas bacterias, sin poseer los riesgos -previamente mencionados- que conllevan otras sustancias. Debido a esto, el presente estudio evalúa la capacidad antimicrobiana de EPA y DHA frente a las bacterias periodonto patógenas en un modelo validado de *biofilm* formado *in vitro*, lo cual puede tener un impacto favorable en el desarrollo de nuevas estrategias para el manejo de la periodontitis.

EPA y DHA -dos de los principales representantes de los LCn3PUFAs, y que se encuentran de manera natural en muchos organismos marinos (Amiri-Jami y cols. 2014; Berge y Barnathan, 2005)- han sido reconocidos durante muchos años como potentes **antimicrobianos** frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Además, como ya se ha comentado previamente, muchos estudios han demostrado que EPA y DHA tienen propiedades **antiinflamatorias** (Amiri-Jami y cols. 2014; Berge y Barnathan, 2005; Calder, 2013a, 2015; Correia y cols. 2012; Correia y cols. 2013; Desbois y Lawlor, 2013; Mil-Homens y cols. 2012) y **antioxidantes** (Giordano y Visioli, 2014), que pueden proporcionar numerosos beneficios adicionales en la terapia periodontal. A pesar de esto, se sabe poco a cerca de su espectro de actividades antimicrobianas o mecanismos de acción frente a los patógenos periodontales, especialmente en estado de *biofilm*.

Por las razones anteriormente mencionadas, dos estudios han investigado recientemente el potencial antibacteriano de EPA y DHA frente a diversos patógenos orales, pero centrándose únicamente en el estudio de bacterias en **estado planctónico** (Choi y cols. 2013; Huang y Ebersole, 2010). Por otro lado, M. Sun y colaboradores investigaron en 2016 los potenciales efectos de EPA y DHA -tanto en estado planctónico como en *biofilms* mono-especie de **dos patógenos periodontales**: *P. gingivalis* y *F. nucleatum*-; así como estudiar las actividades antimicrobianas y anti-*biofilm* de EPA y DHA y sus posibles mecanismos de acción (M. Sun y cols. 2016). Además, M. Sun y colaboradores en 2016 reflejaron que los

compuestos de EPA y DHA tienen capacidad antibacteriana en bacterias periodonto patógenas como *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, tanto en estado planctónico como frente a estos dos patógenos en estado de *biofilm* (M. Sun y cols. 2016).

Cabe destacar que los estudios mencionados emplearon bacterias aisladas para los análisis -salvo M. Sun y colaboradores en 2016, que estudiaron *P. gingivalis* y *F. nucleatum* en *biofilms* mono-especie de estas bacterias- (M. Sun y cols. 2016). Sin embargo, la gran mayoría de las bacterias en la naturaleza, y por ende en la cavidad oral, se encuentran organizadas en *biofilms*. Además, es ampliamente sabido que estos microorganismos en comunidad poseen propiedades diferentes a cuando se encuentran en estado planctónico, siendo una de ellas la mayor resistencia a los agentes antimicrobianos (Costerton, Stewart, y Greenberg, 1999; Gilbert, Das, y Foley, 1997; Gilbert, Maira-Litran, McBain, Rickard, y Whyte, 2002; Marsh, Moter, y Devine, 2011; Socransky y Haffajee, 2002; Stewart y Costerton, 2001). Algunos estudios señalan que la MIC de un organismo puede aumentar de 2 a 1000 veces cuando se encuentra formando parte de un *biofilm* (Stewart y Costerton, 2001), mientras que otros autores lo sitúan en 250 veces mayor que la MIC de la misma especie en estado planctónico (Sedlacek y Walker, 2007). De hecho, se han descrito diversos mecanismos de tolerancia a los agentes antimicrobianos (Hojo, Nagaoka, Ohshima, y Maeda, 2009), siendo uno de ellos que -como describieron Sedlacek and Walker (2007)- la resistencia bacteriana a los antimicrobianos parece estar relacionada con la maduración del *biofilm*, ya que han demostrado un incremento progresivo en la resistencia a los antibióticos a medida que maduran, con el máximo de resistencia alcanzada coincidiendo con la fase estacionaria de crecimiento del *biofilm*. Otro de los mecanismos de resistencia descritos, es que la matriz extracelular presente en la estructura de *biofilm* podría restringir la penetración de los agentes antimicrobianos, limitando su difusión al interior del *biofilm*, de manera que cuanto más pequeña sea una molécula, más fácil será que penetre. Acorde a lo observado en nuestro estudio, en planctónico tanto EPA como DHA presentan una efectividad similar; pero, en cambio, en el estado de *biofilm*, DHA parece ser más efectivo. La hipótesis que explica este fenómeno podría estar relacionada con la existencia de diferencias a nivel de la estructura tridimensional molecular de cada uno de los productos probados. De cualquier modo, son necesarios más estudios en esta línea para tratar de dilucidar si esta es la verdadera razón de este evento.

Estos hallazgos resaltan la necesidad de utilizar modelos de *biofilm* para probar la actividad antibacteriana de los productos antisépticos y por esta razón el presente estudio representa un paso más en el avance de la terapia periodontal, empleando un **modelo de *biofilm* multi-especie de formación *in vitro*** -validado por Sanchez y colaboradores en 2011- incluyendo seis especies relacionadas con las enfermedades periodontales (*S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*) (Sanchez y cols. 2011).

Como han demostrado M. Sun y colaboradores en 2016, DHA y EPA no muestran citotoxicidad en las células de los tejidos humanos orales con una concentración de 100 μ M (M. Sun y cols. 2016). Estos resultados son similares a los que obtuvieron Peng y colaboradores en 2012, demostrando que los mioblastos C2C12 mostraban una tasa de células viables del 95% tras el tratamiento con DHA o EPA (50 μ M and 100 μ M) (Peng y cols. 2012). Todo esto indicaba que, DHA o EPA no reducen la viabilidad bacteriana con estas concentraciones, esta es la razón por la que en estudios posteriores al mencionado se emplea la concentración de 100 μ M.

Los valores de MIC y MBC han demostrado que tanto EPA como DHA poseen actividad bactericida y bacteriostática frente a *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. Sin embargo, los valores de MIC encontrados en este estudio son diferentes a los de Choi y colaboradores en 2013, posiblemente debido a cambios en la metodología incluyendo el tamaño del inóculo o las condiciones de incubación (Desbois y Smith, 2010). Además, la gran variabilidad genética entre las diferentes cepas bacterianas podría llevar a diferentes resultados (Correia y cols. 2012; Desbois y Smith, 2010). En el estudio de Choi y colaboradores en 2013 se incluyeron dos cepas de *P. gingivalis* (KCTC 5352 and KCTC 381) y *F. nucleatum* (KCTC 5105 and KCTC 5172), pero los valores de MIC entre las diferentes cepas bacterianas de la misma bacteria fueron muy diversas (Choi y cols. 2013). Además, los ácidos grasos empleados en el estudio de Choi y colaboradores en 2013 son tanto saturados -ácido palmítico, estérico y araquidónico- como insaturados -linoleico, alpha-linoleico, araquidónico, EPA y DHA-, a diferencia de en el presente estudio donde sólo se emplea EPA y DHA (Choi y cols. 2013).

De acuerdo con las MIC empleadas (100 μ M), en este estudio EPA o DHA mostraron completa inhibición del crecimiento planctónico y de la formación de

biofilm de *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. Estos resultados no coinciden con lo hallado en estudio de M. Sun y colaboradores en 2016, en el que se manifestó que 100 μ M mataban completamente a *P. gingivalis* en la fase exponencial debido a su acción bactericida, mientras que la viabilidad EPA o DHA no inhibían o mataban completamente a *F. nucleatum* (M. Sun y cols. 2016).

Los mecanismos que subyacen a los efectos inhibitorios de EPA o DHA frente a los patógenos orales aun se desconocen. Posiblemente -como se ha descrito en otros PUFAs- DHA y EPA afecten principalmente a la integridad de la membrana plasmática, conllevando al daño de esta y, por consiguiente, a la muerte celular (Desbois y Smith, 2010; Huang y Ebersole, 2010). De acuerdo con este mecanismo, los ácidos grasos se incorporarían en la membrana celular, dando como resultado una mayor fluidez y permeabilidad de la membrana; este efecto podría ser exacerbado por la presencia de dobles enlaces insaturados, ya que parecen ejercer un efecto tóxico hacia la membrana celular bacteriana (Correia y cols. 2012).

De acuerdo con esto, nuestras observaciones de SEM permiten observar ligeros cambios morfológicos, por ejemplo, en *Streptococcus* o *F. nucleatum*, tras el tratamiento con 100 μ M de EPA o DHA, se observan alteraciones en la membrana, llevando a la lisis y a una mayor agregación bacteriana. Estas observaciones coinciden con lo observado por M. Sun y colaboradores en 2016, quienes manifestaron observar alteraciones estructurales mediante SEM, tras el tratamiento con 100 μ M EPA y DHA (M. Sun y cols. 2016). Además, han sido descritos eventos similares en otras bacterias ante la exposición a DHA, como en *Burkholderia cenocepacia* que se agregaba y formaba agrupaciones (Mil-Homens y cols. 2012), o en *Helicobacter pylori* que cambiaba de forma bacilar a forma de cocos (Correia y cols. 2012). Parece coherente asociar estos cambios con la reducción en la viabilidad bacteriana (Correia y cols. 2012; Mil-Homens y cols. 2012).

En el análisis por qPCR del presente estudio se ha demostrado que los extractos probados (EPA y DHA) reducen significativamente ($p < 0,001$) la viabilidad bacteriana de cada especie periodonto patógena probada, frente al control. Incluso EPA -en especies como *V. parvula*, *F. nucleatum* o *P. gingivalis*- muestra mayor poder antiséptico que la CHX 0,2% que es el antiséptico *Gold standard*. También en el

análisis por CLSM se ha observado de forma la efectividad -incluso superior a la CHX 0,2%- de los extractos probados reduciendo la viabilidad celular. En el caso de la muestra tratada con DHA se ha detectado una bajísima señal verde (células vivas), detectando casi únicamente señal roja (células muertas); y de forma similar ha ocurrido en el caso del tratamiento con EPA, aunque de manera menos pronunciada.

El hecho de que la CHX sea considerado como el antiséptico *Gold standard* ha podido ser demostrado en estudios previos, como el de Sanchez y colaboradores en 2017 o el de Al-Radha y colaboradores en 2013, donde se ha avalado como el agente antiséptico más idóneo y efectivo en la superficie de implantes, y de hecho superior a otros agentes antimicrobianos tanto *in vitro* como *in vivo* (Al-Radha, Younes, Diab y Jenkinson 2013; Sanchez y cols. 2017). Pese a que en el presente estudio se ha observado que los LNC3PUFAs pueden ser más efectivos que CHX, todavía hay que valorar la capacidad de formulación farmacológica que este producto presenta, así como su farmacocinética. Ya que una de las ventajas de las moléculas de CHX es que se unen de forma reversible a los tejidos orales, liberándose de forma lenta y sostenida (Bonesvoll, Lokken, y Rolla, 1974; Bonesvoll, Lokken, Rolla, y Paus, 1974) permitiendo -gracias a su **sustantividad** (duración de la acción antiséptica *in vivo* y medida del tiempo de contacto entre el agente y el substrato en un medio concreto- que sus efectos antimicrobianos se mantengan hasta 12 h (Schiott y cols. 1970). Por esta razón, se necesita más investigación con relación a este aspecto, debemos estudiar la sustentividad de los extractos de EPA y DHA, así como su farmacocinética, para poder considerar a estos extractos como alternativas reales al producto considerado actualmente como *Gold standard*: la CHX.

M. Sun y colaboradores en 2016 han descrito que, para prevenir las infecciones de forma más efectiva, no solo se debe prevenir la formación del *biofilm*, sino que también debemos inhibir aquellos *biofilms* ya formados (M. Sun y cols. 2016). De forma interesante, en nuestro estudio, DHA o EPA no solo han demostrado inhibir la formación, sino también ocasionar la destrucción de *biofilms* maduros. Este efecto puede ser principalmente debido a la reducción en el crecimiento bacteriano, que se refleja con un menor espesor del *biofilm* y mayor muerte celular, que a su vez se relaciona con un incremento en la expresión de la señal de tinción roja por CLSM (Zhou y cols. 2014).

Así pues, los resultados de esta investigación sugieren que EPA y DHA reúnen efectos antimicrobianos ideales frente a patógenos periodontales en estado planctónico o de *biofilm*. Han demostrado no ser citotóxicos, así como reducir significativamente el recuento bacteriano de las bacterias incluidas en el modelo de *biofilm in vitro*. Por lo tanto, se sugiere que EPA o DHA pueden ser firmemente propuestos como agentes terapéuticos adecuados para la prevención y tratamiento de la periodontitis.

Hasta donde sabemos, el presente estudio es el primero que ha evaluado el efecto antibacteriano de los extractos de EPA y DHA en un modelo validado de *biofilm* multi-especies *in vitro* (Sanchez y cols. 2011). Sin embargo, también se deben reconocer algunas limitaciones, entre las que se incluyen: que en este modelo solo se consideran seis de las especies dentro del gran número de especies que pueden encontrarse en la bolsa periodontal, además es un modelo de *biofilm* estático y en su diseño actual no involucra el efecto de las células del sistema inmune. Además, con respecto a los extractos analizados como potenciales agentes antimicrobianos, nos encontramos con una importante limitación: en su formulación comercial están disueltos en EtOH a concentraciones diferentes en cada uno de ellos. Esto nos obliga a incluir EtOH en nuestros experimentos como control (a la misma concentración que la encontrada en cada uno de los productos comerciales) para descartar que el potencial efecto antiséptico de estos agentes sea debido a este y no realmente a los extractos probados; con las consiguientes complicaciones que conlleva un control más en el experimento. Así mismo, es conveniente tener en cuenta que en la actualidad existe tendencia a eliminar el EtOH de los colutorios, por los posibles efectos negativos que este puede ocasionar en las mucosas; por lo que, de acuerdo con esta tendencia y de cara al posible futuro desarrollo de un colutorio basado en estos extractos, sería relevante conseguir solubilizar estos productos en otro agente distinto del EtOH.

Por lo tanto, los resultados del presente estudio deben ser interpretados con cautela, siendo necesarios estudios futuros en modelos de *biofilm* de flujo dinámico y en modelos animales *in vivo*, que revelen si los extractos de EPA y DHA podrían suponer un avance real en la terapia periodontal.

7. CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación proporcionan evidencia de que los extractos tanto de EPA como de DHA presentan capacidad antibacteriana frente a seis especies bacterianas organizadas en *biofilm* en un modelo validado de *biofilm in vitro*.

De manera específica, se puede concluir que:

- En relación con los datos de MICs y MBCs obtenidos, se puede afirmar que los extractos naturales tanto de EPA como de DHA manifiestan su mayor potencial antimicrobiano, frente los patógenos periodontales *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, en estado planctónico.
- Con respecto a la capacidad antibacteriana, los extractos de EPA y DHA (100 µM/mL) produjeron reducciones significativas de dos a tres órdenes de magnitud en las UFC/mL de *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, en el modelo de *biofilm in vitro*, tras 60 segundos de exposición, por lo que se puede determinar que los agentes probados tienen eficacia como agentes antibacterianos.

8. APÉNDICES

8.1. Resultados Test Kruskal Wallis

8.1.1. DHA

Tabla 8 - Efecto antimicrobiano de los extractos de DHA en el numero medio de bacterias viables (expresado en UFC/mL) en el *biofilm* de crecimiento *in vitro*, cuantificadas mediante la técnica de qPCR. Los datos fueron expresados como medianas y grados de libertad obtenidos a través del test Kruskal Wallis. PBS: Tampón fosfato salino; EtOH: Etanol.

	Tratamiento	N	Mediana	Intervalo Intercuartil
So	PBS	9	$3,18 \times 10^1$	$4,87 \times 10^7$
	DHA		5×10^0	$6,76 \times 10^3$
	EtOH		$2,32 \times 10^1$	$9,68 \times 10^6$
	CHX		$1,40 \times 10^1$	$6,69 \times 10^5$
An	PBS	9	$3,09 \times 10^1$	$1,13 \times 10^6$
	DHA		5×10^0	$2,76 \times 10^3$
	EtOH		$2,41 \times 10^1$	$1,45 \times 10^6$
	CHX		$1,40 \times 10^1$	$2,42 \times 10^5$
Vp	PBS	9	$3,19 \times 10^1$	$1,63 \times 10^7$
	DHA		5×10^0	$3,77 \times 10^4$
	EtOH		$2,20 \times 10^1$	$9,59 \times 10^6$
	CHX		$1,51 \times 10^1$	$3,87 \times 10^6$
Fn	PBS	9	$2,84 \times 10^1$	$1,45 \times 10^6$
	DHA		5×10^0	$1,56 \times 10^3$
	EtOH		$1,60 \times 10^1$	$4,71 \times 10^5$
	CHX		$2,46 \times 10^1$	$1,75 \times 10^6$
Pg	PBS	9	$3,20 \times 10^1$	$1,30 \times 10^7$
	DHA		5×10^0	$3,87 \times 10^3$
	EtOH		$2,20 \times 10^1$	$5,93 \times 10^5$
	CHX		$1,50 \times 10^1$	$9,41 \times 10^5$
Aa	PBS	9	$3,12 \times 10^1$	$8,89 \times 10^6$
	DHA		5×10^0	$6,26 \times 10^3$
	EtOH		$2,35 \times 10^1$	$3,21 \times 10^6$
	CHX		$1,43 \times 10^1$	$1,10 \times 10^6$

8.1.2. EPA

Tabla 9 - Efecto antimicrobiano de los extractos de EPA en el número medio de bacterias viables (expresado en UFC/mL) en el *biofilm* de crecimiento *in vitro*, cuantificadas mediante la técnica de qPCR. Los datos fueron expresados como medianas y grados de libertad obtenidos a través del test Kruskal Wallis. PBS: Tampón fosfato salino; EtOH: Etanol.

	Tratamiento	N	Mediana	Intervalo Intercuartil
So	PBS	9	$3,20 \times 10^1$	$1,93 \times 10^7$
	EPA		$8,33 \times 10^0$	$7,09 \times 10^5$
	EtOH		$2,30 \times 10^1$	$4,52 \times 10^6$
	CHX		$1,07 \times 10^1$	$1,29 \times 10^6$
An	PBS	9	$3,20 \times 10^1$	$2,10 \times 10^6$
	EPA		5×10^0	$3,43 \times 10^4$
	EtOH		$2,15 \times 10^1$	$2,99 \times 10^5$
	CHX		$1,55 \times 10^1$	$1,88 \times 10^5$
Vp	PBS	9	$3,16 \times 10^1$	$1,96 \times 10^7$
	EPA		$5,44 \times 10^0$	$1,33 \times 10^6$
	EtOH		$2,01 \times 10^1$	$4,43 \times 10^6$
	CHX		$1,69 \times 10^1$	$1,83 \times 10^7$
Fn	PBS	9	$2,95 \times 10^1$	$1,92 \times 10^6$
	EPA		5×10^0	$2,16 \times 10^4$
	EtOH		$1,58 \times 10^1$	$3,64 \times 10^5$
	CHX		$2,37 \times 10^1$	$9,59 \times 10^5$
Pg	PBS	9	$3,20 \times 10^1$	$3,14 \times 10^6$
	EPA		5×10^0	$1,72 \times 10^5$
	EtOH		$1,98 \times 10^1$	$8,61 \times 10^5$
	CHX		$1,72 \times 10^1$	$4,05 \times 10^5$
Aa	PBS	9	$3,08 \times 10^1$	$6,03 \times 10^6$
	EPA		$5,78 \times 10^0$	$5,01 \times 10^5$
	EtOH		$1,91 \times 10^1$	$1,22 \times 10^6$
	CHX		$1,83 \times 10^1$	$1,67 \times 10^6$

8.2. Abreviaturas

AAP: Academia Americana de Periodoncia

A. a / A. actinomycetemcomitans: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. n / A. naeslundii: *Actinomyces naeslundii*

AC – PACS: *A-type proanthocyanidins* (Proantocianidinas de tipo A)

BHI: *Brain-Heart Infusion* (Infusión cerebro-corazón)

CIAL: Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

CHX: Digluconato de clorhexidina

CLSM: *Confocal laser scanning microscopy* (Microscopía de barrido laser confocal)

Cq: Ciclo de cuantificación

Ct: Umbral del ciclo

DART: Pruebas relacionadas con la dieta y el infarto

DHA: Ácido docosahexaenoico

DMSO: *Dimethyl sulfoxide* (Dimetilsulfóxido)

DS / SD: Desviación estándar / *Standard deviation*

EFP: Federación Europea de Periodoncia

EGCG: *Epigallocatechin gallate* (Galato de epigallocatequina)

EPA: Ácido eicosapentaenoico

ETEP: Etiología y Terapéutica de las Enfermedades Periodontales

EtOH: Etanol

FA-EE: Forma etil éster

FDI: Federación Dental Internacional

F. n / F. nucleatum: *Fusobacterium nucleatum*

HA: Hidroxiapatita

ICTS: Centro nacional de microscopía electrónica

IP: Ioduro de propidio

Log: Logaritmo

LCn3PUFAs: n-3 PUFAs

MBC: *Minimum bactericidal concentration* (Concentración mínima bactericida)

MIC: *Minimum inhibitory concentration* (Concentración mínima inhibitoria)

MI: Infarto de miocardio

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

NMD: *Non-dialyzable constituent fraction of cranberry* (Fracción no dializable del arándano rojo)

PBS: *Phosphate buffer saline* (Solución salina tamponada con fosfato)

P. g / P. gingivalis: *Porphyromonas gingivalis*

PMA: *Propidium monoazide* (Propidio de monoazida)

qPCR: *Quantitative real-time polymerase chain reaction* (Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real)

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RA: Artritis reumatoide

SEM: *Scanning electron microscopy* (Microscopía electrónica de barrido)

S. o / S. *oralis*: *Streptococcus oralis*

UFC/mL / CFU/mL: Unidades formadoras de colonias por mililitro / Colony forming units per milliliter

V. p / V. *parvula*: *Veillonella parvula*

8.3. Divulgación de los resultados de esta investigación

8.3.1. Comunicaciones formato Póster en congresos nacionales

- Actividad antimicrobiana de ácidos grasos Omega-3 frente a bacterias patógenas orales. Un estudio *in vitro*.

Andrea Alonso, Honorato Ribeiro-Vidal, María del Carmen Sánchez, Maria José Ciudad, Luis Rodolfo Collado, David Herrera, Mariano Sanz, Elena Figuero, Bettina Alonso.

XVII Curso de metodología de investigación en Periodoncia y Osteointegración
Oviedo, 22 y 23 de febrero de 2019

8.3.2. Comunicaciones Orales en congresos nacionales e internacionales

- Antimicrobial Activity of Omega-3 Fatty Acids Against Oral Pathogenic Bacteria.

Andrea Alonso, Honorato Ribeiro-Vidal, María del Carmen Sánchez, Bettina Alonso, Elena Figuero, Maria José Ciudad, Luis Rodolfo Collado, David Herrera, Mariano Sanz.

CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress 2019

Madrid, 19 - 21 de septiembre de 2019

(Aceptada)

8.4. Índice de figuras

Figura 1 – Estructura química de EPA en conformación lineal con numeración desde ambas terminaciones. Adaptado de Desbois and Smith (2010).....	33
Figura 2 – Estructura química de EPA en conformación no lineal. Adaptado de Holub (2002).....	34
Figura 3 – Modelo especial de EPA. Adaptado de una imagen creada por Ben Mills con Accelrys DS Visualizer.....	34
Figura 4 – Estructura química de DHA en conformación lineal con numeración desde ambas terminaciones. Adaptado de Desbois and Smith (2010).....	34
Figura 5 – Estructura química de DHA en conformación no lineal. Adaptado de Holub (2002).....	35
Figura 6 – Modelo especial de DHA. Adaptado de una imagen creada por Ben Mills con Accelrys DS Visualizer.....	35
Figura 7 – Efectos fisiológicos descritos de los PUFAs. Adaptado de (Chee y cols. 2016).....	37
Figura 8 – Representación esquemática de las posibles dianas celulares y mecanismos antibacterianos de la acción antibacteriana de los PUFAs. Adaptado de (Desbois y Smith, 2010).....	39
Figura 9 – Vías del metabolismo del ácido araquidónico. Adaptado de (Chee y cols. 2016).....	41
Figura 10 – EPA y DHA de la marca Cerilliant® perteneciente a la casa comercial Sigma-ALDRICH®.....	48
Figura 11 – Curvas de crecimiento de las especies bacterianas empleadas en el modelo de <i>biofilm</i> validado <i>in vitro</i> (Sanchez y cols. 2011). OD, Densidad óptica medida a 550 nm; t, tiempo; h, horas.....	50

Figura 12 – Espectrofotómetro de Optic Ivy System 2100-C; I.C.T.; La Rioja, España. Laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología, Universidad Complutense de Madrid.....	51
Figura 13 – Representación esquemática del cálculo de MIC y de MBC.....	52
Figura 14 – Representación esquemática del modelo de <i>biofilm</i> subgingival multi-especies <i>in vitro</i> , según (Sanchez y cols. 2011). Tras cada paso, se incubó en condiciones de anaerobiosis (10% H ₂ , 10% de CO ₂ y N ₂ en equilibrio) a 37°C.....	54
Figura 15 – Representación esquemática del modelo de evaluación de la capacidad antimicrobiana de EPA y DHA.....	55
Figura 16 – Termociclador <i>LightCycler</i> [®] 480 II <i>thermocycler</i> (Roche). Laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología, Universidad Complutense de Madrid.....	58
Figura 17 – Representación esquemática del procesamiento de muestras por qPCR.....	59
Figura 18 – Representación esquemática del análisis de muestras mediante CLSM.....	60
Figura 19 – Microscopio Ix83 <i>Olympus</i> (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japón). ICTS (Universidad Complutense, Madrid, España).....	61
Figura 20 – Microscopio electrónico JSM 6400 (JSM 6400; JEOL, Tokio, Japón). ICTS (Universidad Complutense, Madrid, España).....	62
Figura 21 – Representación de los <i>box plot</i> del efecto en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de las seis especies bacterianas (So – <i>Streptococcus oralis</i> ; An – <i>Actinomyces naeslundii</i> ; Vp – <i>Veillonella parvula</i> ; Aa – <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ; Pg - <i>Porphyromonas gingivalis</i> ; Fn – <i>Fusobacterium nucleatum</i> , organizadas en <i>biofilm</i> tras el tratamiento con los extractos de DHA (100 µM/mL) durante 60 segundos de exposición, respecto al control negativo (PBS), EtOH y al control positivo (CHX 0,2%)......	69

Figura 22 – Máxima proyección de imágenes obtenidas por microscopía de barrido láser confocal (CLSM) de los *biofilms* de 72 h, donde se observa el crecimiento de esos *biofilms* sobre las superficies de los discos de HA, teñidas con *LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit*, tras 60 segundos de exposición: (A) al control negativo (PBS); (B) a la solución de EtOH; (C) a los extractos de DHA (concentración de 100 µM/mL) y (D) a la CHX al 0,2%.....71

Figura 23 – Microscopía electrónica de barrido (SEM) de *biofilms* de 72 horas de evolución en discos de hidroxiapatita (HA) tratados con el control negativo: PBS (A), con DHA (B), con EtOH (C) o con el control positivo: CHX 0,2% (D). Se pudo observar una población bacteriana densa en los discos de HA tratados con PBS (A), formando capas discontinuas de bacterias adheridas a los discos. Mientras que, los *biofilms* de los discos tratados con DHA (B), se pudo observar una menor densidad de células distribuidas por la superficie del disco e incluso algunas de ellas manifestando daño estructural. Así mismo, en los discos tratados con EtOH (C) o CHX 0,2% (D), también se pudo observar una reducción -aunque más ligera que en los discos tratados con DHA (B)- en la densidad bacteriana presente en la superficie del disco. Pueden identificarse cadenas de *Aggregatibacter* y/o *Streptococcus* (Flecha azul) y bacilos fusiformes del género *F. nucleatum* (Flecha amarilla). Aumento (A-D): 1.500X.....72

Figura 24 – Representación de los *box plot* del efecto en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de las seis especies bacterianas (So – *Streptococcus oralis*; An – *Actinomyces naeslundii*; Vp – *Veillonella parvula*; Aa – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Pg – *Porphyromonas gingivalis*; Fn – *Fusobacterium nucleatum*, organizadas en *biofilm* tras el tratamiento con los extractos de EPA (100 µM/mL) durante 60 segundos de exposición, respecto al control negativo (PBS), EtOH y al control positivo (CHX 0,2%).....76

Figura 25 – Máxima proyección de imágenes obtenidas por microscopía de barrido láser confocal (CLSM) de los *biofilms* de 72 h, donde se observa el crecimiento de esos *biofilms* sobre las superficies de los discos de HA, teñidas con *LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit*, tras 60 segundos de exposición: (A) al control negativo (PBS); (B) a la solución de EtOH; (C) a los extractos de EPA (concentración de 100 µM/mL) y (D) a la CHX al 0,2%.....78

Figura 26 – Microscopía electrónica de barrido (SEM) de *biofilms* de 72 horas de evolución en discos de hidroxiapatita (HA) tratados con el control negativo: PBS (A), con EPA (B), con EtOH (C) o con el control positivo: CHX 0,2% (D). Se pudo observar una población bacteriana densa en los discos de HA tratados con PBS (A), formando capas discontinuas de bacterias adheridas a los discos. Mientras que, los *biofilms* de los discos tratados con EPA (B), se pudo observar una menor densidad de células distribuidas por la superficie del disco e incluso algunas de ellas manifestando daño estructural. Así mismo, en los discos tratados con EtOH (C) o CHX 0,2% (D), también se pudo observar una reducción -aunque más ligera que en los discos tratados con EPA (B)- en la densidad bacteriana presente en la superficie del disco. Pueden identificarse cadenas de *Aggregatibacter* y/o *Streptococcus* (Flecha azul) y bacilos fusiformes del género *F. nucleatum* (Flecha amarilla). Aumento (A-D): 1.500X.....79

8.5. Índice de tablas

Tabla 1 – Contenido en EPA y DHA que se encuentra en pescado, marisco, otros alimentos y suplementos de aceite de pescado. Adaptado de Holub (2002).....	36
Tabla 2 – Posibles mecanismos de los efectos cardiovasculares descritos de EPA y DHA. Adaptado de (Holub, 2002).....	38
Tabla 3 – Cepas seleccionadas y condiciones de cultivo.....	49
Tabla 4 – Cepas seleccionadas y su concentración final en el preinóculo.....	53
Tabla 5 – Secuencias de los cebadores y sondas utilizados para la detección y cuantificación del ADN genómico de las bacterias involucradas en el desarrollo del <i>biofilm</i> . Tanto los cebadores como las sondas se han dirigido al gen 16S rRNA en todos los casos (Sanchez, Marin, y cols. 2014).....	57
Tabla 6 – Efecto antimicrobiano de los extractos de DHA en el numero medio de bacterias viables (expresado en UFC/mL) en el <i>biofilm</i> de crecimiento <i>in vitro</i> , cuantificadas mediante la técnica de qPCR. Los datos fueron expresados como medias con DE y fueron obtenidos a través del test ANOVA y las correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los datos obtenidos a través del test Kruskal Wallis expresados como medianas y grados de libertad se incluyen en el apéndice 8.1.....	70
Tabla 7 – Efecto antimicrobiano de los extractos de EPA en el numero medio de bacterias viables (expresado en UFC/mL) en el <i>biofilm</i> de crecimiento <i>in vitro</i> , cuantificadas mediante la técnica de qPCR. Los datos fueron expresados como medias con DE y fueron obtenidos a través del test ANOVA y las correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los datos obtenidos a través del test Kruskal Wallis expresados como medianas y grados de libertad se incluyen en el apéndice 8.1.....	77
Tabla 8 – Efecto antimicrobiano de los extractos de DHA en el numero medio de bacterias viables (expresado en UFC/mL) en el <i>biofilm</i> de crecimiento <i>in vitro</i> , cuantificadas mediante la técnica de qPCR. Los datos fueron expresados como	

medianas y grados de libertad obtenidos a través del test Kruskal Wallis.....92

Tabla 9 – Efecto antimicrobiano de los extractos de EPA en el numero medio de bacterias viables (expresado en UFC/mL) en el *biofilm* de crecimiento *in vitro*, cuantificadas mediante la técnica de qPCR. Los datos fueron expresados como medianas y grados de libertad obtenidos a través del test Kruskal Wallis.....93

9. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Radha, A. S., Younes, C., Diab, B. S., & Jenkinson, H. F. (2013). Essential oils and zirconia dental implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **28**(6), 1497-1505. doi:10.11607/jomi.3142
- Alam, S. Q., Bergens, B. M., & Alam, B. S. (1991). Arachidonic acid, prostaglandin E2 and leukotriene C4 levels in gingiva and submandibular salivary glands of rats fed diets containing n-3 fatty acids. *Lipids*, **26**(11), 895-900.
- Amiri-Jami, M., Lapointe, G., & Griffiths, M. W. (2014). Engineering of EPA/DHA omega-3 fatty acid production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Appl Microbiol Biotechnol*, **98**(7), 3071-3080. doi:10.1007/s00253-013-5381-0
- Axelsson, P., & Lindhe, J. (1981). The significance of maintenance care in the treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol*, **8**(4), 281-294.
- Axelsson, P., Nystrom, B., & Lindhe, J. (2004). The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance. *J Clin Periodontol*, **31**(9), 749-757. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00563.x
- Bagga, D., Wang, L., Farias-Eisner, R., Glaspy, J. A., & Reddy, S. T. (2003). Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(4), 1751-1756. doi:10.1073/pnas.0334211100
- Barbieri, R., Coppo, E., Marchese, A., Daglia, M., Sobarzo-Sanchez, E., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2017). Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiol Res*, **196**, 44-68. doi:10.1016/j.micres.2016.12.003
- Bartold, P. M., du Bois, A. H., Gannon, S., Haynes, D. R., & Hirsch, R. S. (2013). Antibacterial and immunomodulatory properties of azithromycin treatment implications for periodontitis. *Inflammopharmacology*, **21**(4), 321-338. doi:10.1007/s10787-012-0165-1
- Beikler, T., Abdeen, G., Schnitzer, S., Salzer, S., Ehmke, B., Heinecke, A., & Flemmig, T. F. (2004). Microbiological shifts in intra- and extraoral habitats following

- mechanical periodontal therapy. *J Clin Periodontol*, **31**(9), 777-783. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00557.x
- Beikler, T., & Flemmig, T. F. (2011). Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures. *Periodontol 2000*, **55**(1), 87-103. doi:10.1111/j.1600-0757.2010.00360.x
- Bendyk, A., Marino, V., Zilm, P. S., Howe, P., & Bartold, P. M. (2009). Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on experimental periodontitis in the mouse. *J Periodontal Res*, **44**(2), 211-216. doi:10.1111/j.1600-0765.2008.01108.x
- Berge, J. P., & Barnathan, G. (2005). Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **96**, 49-125.
- Bezerra, M. M., de Lima, V., Alencar, V. B., Vieira, I. B., Brito, G. A., Ribeiro, R. A., & Rocha, F. A. (2000). Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*, **71**(6), 1009-1014. doi:10.1902/jop.2000.71.6.1009
- Bonesvoll, P., Lokken, P., & Rolla, G. (1974). Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Arch Oral Biol*, **19**(11), 1025-1029. doi:10.1016/0003-9969(74)90089-2
- Bonesvoll, P., Lokken, P., Rolla, G., & Paus, P. N. (1974). Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Arch Oral Biol*, **19**(3), 209-212. doi:10.1016/0003-9969(74)90263-5
- Boyaval, P., Corre, C., Dupuis, C., & Roussel, E. (1995). Effects of free fatty acids on propionic acid bacteria. *Le Lait*, **75**(1), 17-29.
- Bravo Pérez, M., Almerich Silla, J., Ausina Márquez, V., Avilés Gutiérrez, P., Blanco González, J., Canorea Díaz, E., . . . Llodra Calvo, J. C. (2016). Encuesta de salud oral en España 2015. *RCOE. Revista del Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España*, 2016, vol. **21**, num. Sup. 1, p. 8-48.
- Burr, M. L., Fehily, A. M., Gilbert, J. F., Rogers, S., Holliday, R. M., Sweetnam, P. M., . . . Deadman, N. M. (1989). Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet*, **2**(8666), 757-761. doi:10.1016/s0140-6736(89)90828-3

- Cabal, B., Cafini, F., Esteban-Tejeda, L., Alou, L., Bartolome, J. F., Sevillano, D., . . . Moya, J. S. (2012). Inhibitory effect on in vitro *Streptococcus oralis* biofilm of a soda-lime glass containing silver nanoparticles coating on titanium alloy. *PLoS One*, **7**(8), e42393. doi:10.1371/journal.pone.0042393
- Calder, P. C. (2009). Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*, **91**(6), 791-795. doi:10.1016/j.biochi.2009.01.008
- Calder, P. C. (2013a). n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. *Proc Nutr Soc*, **72**(3), 326-336. doi:10.1017/s0029665113001031
- Calder, P. C. (2013b). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol*, **75**(3), 645-662. doi:10.1111/j.1365-2125.2012.04374.x
- Calder, P. C. (2015). Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*, **1851**(4), 469-484. doi:10.1016/j.bbalip.2014.08.010
- Camelo-Castillo, A., Novoa, L., Balsa-Castro, C., Blanco, J., Mira, A., & Tomas, I. (2015). Relationship between periodontitis-associated subgingival microbiota and clinical inflammation by 16S pyrosequencing. *J Clin Periodontol*, **42**(12), 1074-1082. doi:10.1111/jcpe.12470
- Carasol, M., Llodra, J. C., Fernandez-Meseguer, A., Bravo, M., Garcia-Margallo, M. T., Calvo-Bonacho, E., . . . Herrera, D. (2016). Periodontal conditions among employed adults in Spain. *J Clin Periodontol*, **43**(7), 548-556. doi:10.1111/jcpe.12558
- Caton, J. G., Ciancio, S. G., Blieden, T. M., Bradshaw, M., Crout, R. J., Hefti, A. F., . . . Walker, C. (2000). Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis. *J Periodontol*, **71**(4), 521-532. doi:10.1902/jop.2000.71.4.521
- Caughey, G. E., Mantzioris, E., Gibson, R. A., Cleland, L. G., & James, M. J. (1996). The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr*, **63**(1), 116-122. doi:10.1093/ajcn/63.1.116

- Chee, B., Park, B., Fitzsimmons, T., Coates, A. M., & Bartold, P. M. (2016). Omega-3 fatty acids as an adjunct for periodontal therapy-a review. *Clin Oral Investig*, **20**(5), 879-894. doi:10.1007/s00784-016-1750-2
- Choi, J. S., Park, N. H., Hwang, S. Y., Sohn, J. H., Kwak, I., Cho, K. K., & Choi, I. S. (2013). The antibacterial activity of various saturated and unsaturated fatty acids against several oral pathogens. *J Environ Biol*, **34**(4), 673-676.
- Christersson, L. A., Slots, J., Rosling, B. G., & Genco, R. J. (1985). Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol*, **12**(6), 465-476.
- Chung, S. Y., Song, K. B., Lee, S. G., & Choi, Y. H. (2011). The strength of age effect on tooth loss and periodontal condition in Korean elderly. *Arch Gerontol Geriatr*, **53**(2), e243-248. doi:10.1016/j.archger.2011.04.021
- Clarke, S. R., Mohamed, R., Bian, L., Routh, A. F., Kokai-Kun, J. F., Mond, J. J., . . . Foster, S. J. (2007). The Staphylococcus aureus surface protein IsdA mediates resistance to innate defenses of human skin. *Cell Host Microbe*, **1**(3), 199-212. doi:10.1016/j.chom.2007.04.005
- Cleland, L. G., James, M. J., & Proudman, S. M. (2006). Fish oil: what the prescriber needs to know. *Arthritis Res Ther*, **8**(1), 202. doi:10.1186/ar1876
- Cobb, C. M. (2002). Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. *J Clin Periodontol*, **29 Suppl 2**, 6-16.
- Cobb, C. M., Martel, C. R., McKnight, S. A., 3rd, Pasley-Mowry, C., Ferguson, B. L., & Williams, K. (2002). How does time-dependent dental unit waterline flushing affect planktonic bacteria levels? *J Dent Educ*, **66**(4), 549-555.
- Correia, M., Michel, V., Matos, A. A., Carvalho, P., Oliveira, M. J., Ferreira, R. M., . . . Touati, E. (2012). Docosahexaenoic acid inhibits Helicobacter pylori growth in vitro and mice gastric mucosa colonization. *PLoS One*, **7**(4), e35072. doi:10.1371/journal.pone.0035072
- Correia, M., Michel, V., Osorio, H., El Ghachi, M., Bonis, M., Boneca, I. G., . . . Touati, E. (2013). Crosstalk between Helicobacter pylori and gastric epithelial cells is impaired by docosahexaenoic acid. *PLoS One*, **8**(4), e60657. doi:10.1371/journal.pone.0060657

- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**(5418), 1318-1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318
- Crasta, K., Daly, C. G., Mitchell, D., Curtis, B., Stewart, D., & Heitz-Mayfield, L. J. (2009). Bacteraemia due to dental flossing. *J Clin Periodontol*, **36**(4), 323-332. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01372.x
- Cullinan, M. P., Westerman, B., Hamlet, S. M., Palmer, J. E., Faddy, M. J., Lang, N. P., & Seymour, G. J. (2001). A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *J Clin Periodontol*, **28**(12), 1137-1144.
- Dabholkar, C. S., Shah, M., Kathariya, R., Bajaj, M., & Doshi, Y. (2016). Comparative Evaluation of Antimicrobial Activity of Pomegranate-Containing Mouthwash Against Oral-Biofilm Forming Organisms: An Invitro Microbial Study. *J Clin Diagn Res*, **10**(3), Zc65-69. doi:10.7860/jcdr/2016/16478.7475
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*, **2**(2), 114-122. doi:10.1038/nrd1008
- Dawson, D. R., 3rd, Branch-Mays, G., Gonzalez, O. A., & Ebersole, J. L. (2014). Dietary modulation of the inflammatory cascade. *Periodontol 2000*, **64**(1), 161-197. doi:10.1111/j.1600-0757.2012.00458.x
- Desbois, A. P. (2012). Potential applications of antimicrobial fatty acids in medicine, agriculture and other industries. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, **7**(2), 111-122.
- Desbois, A. P., & Lawlor, K. C. (2013). Antibacterial activity of long-chain polyunsaturated fatty acids against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. *Mar Drugs*, **11**(11), 4544-4557. doi:10.3390/md11114544
- Desbois, A. P., Mearns-Spragg, A., & Smith, V. J. (2009). A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Mar Biotechnol (NY)*, **11**(1), 45-52. doi:10.1007/s10126-008-9118-5
- Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, **85**(6), 1629-1642. doi:10.1007/s00253-009-2355-3

- Diaz, P. I., Chalmers, N. I., Rickard, A. H., Kong, C., Milburn, C. L., Palmer, R. J., Jr., & Kolenbrander, P. E. (2006). Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol*, **72**(4), 2837-2848. doi:10.1128/aem.72.4.2837-2848.2006
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, **15**(2), 167-193. doi:10.1128/cmr.15.2.167-193.2002
- Dyall, S. C., & Michael-Titus, A. T. (2008). Neurological benefits of omega-3 fatty acids. *Neuromolecular Med*, **10**(4), 219-235. doi:10.1007/s12017-008-8036-z
- Eke, P. I., Dye, B. A., Wei, L., Slade, G. D., Thornton-Evans, G. O., Borgnakke, W. S., . . . Genco, R. J. (2015). Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol*, **86**(5), 611-622. doi:10.1902/jop.2015.140520
- Endres, S., Ghorbani, R., Kelley, V. E., Georgilis, K., Lonnemann, G., van der Meer, J. W., . . . et al. (1989). The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med*, **320**(5), 265-271. doi:10.1056/nejm198902023200501
- Figuero, E., Sanchez-Beltran, M., Cuesta-Frechoso, S., Tejerina, J. M., del Castro, J. A., Gutierrez, J. M., . . . Sanz, M. (2011). Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol*, **82**(10), 1469-1477. doi:10.1902/jop.2011.100719
- Filoche, S., Wong, L., & Sissons, C. H. (2010). Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res*, **89**(1), 8-18. doi:10.1177/0022034509351812
- Fisher, M., Levine, P. H., Weiner, B. H., Johnson, M. H., Doyle, E. M., Ellis, P. A., & Hoogasian, J. J. (1990). Dietary n-3 fatty acid supplementation reduces superoxide production and chemiluminescence in a monocyte-enriched preparation of leukocytes. *Am J Clin Nutr*, **51**(5), 804-808. doi:10.1093/ajcn/51.5.804
- Forner, L., Larsen, T., Kilian, M., & Holmstrup, P. (2006). Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol*, **33**(6), 401-407. doi:10.1111/j.1600-051X.2006.00924.x

- Franks, N. P., & Honore, E. (2004). The TREK K2P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci*, **25**(11), 601-608. doi:10.1016/j.tips.2004.09.003
- Frencken, J. E., Sharma, P., Stenhouse, L., Green, D., Lavery, D., & Dietrich, T. (2017). Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *J Clin Periodontol*, **44 Suppl 18**, S94-s105. doi:10.1111/jcpe.12677
- Gajardo, M., Silva, N., Gomez, L., Leon, R., Parra, B., Contreras, A., & Gamonal, J. (2005). Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol*, **76**(2), 289-294. doi:10.1902/jop.2005.76.2.289
- Galbraith, H., & Miller, T. B. (1973). Effect of long chain fatty acids on bacterial respiration and amino acid uptake. *J Appl Bacteriol*, **36**(4), 659-675.
- Gemmell, E., & Seymour, G. J. (2004). Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000*, **35**, 21-41. doi:10.1111/j.0906-6713.2004.003557.x
- Gilbert, P., Das, J., & Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res*, **11**(1), 160-167. doi:10.1177/08959374970110010701
- Gilbert, P., Maira-Litran, T., McBain, A. J., Rickard, A. H., & Whyte, F. W. (2002). The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol*, **46**, 202-256.
- Giordano, E., & Visioli, F. (2014). Long-chain omega 3 fatty acids: molecular bases of potential antioxidant actions. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **90**(1), 1-4. doi:10.1016/j.plefa.2013.11.002
- Golub, L. M., Lee, H. M., Lehrer, G., Nemiroff, A., McNamara, T. F., Kaplan, R., & Ramamurthy, N. S. (1983). Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. *J Periodontal Res*, **18**(5), 516-526.
- Haffajee, A. D., Bogren, A., Hasturk, H., Feres, M., Lopez, N. J., & Socransky, S. S. (2004). Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol*, **31**(11), 996-1002. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00597.x

- Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Dibart, S., Smith, C., Kent, R. L., Jr., & Socransky, S. S. (1997). The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, **24**(5), 324-334.
- Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*, **5**, 78-111.
- Haffajee, A. D., Teles, R. P., & Socransky, S. S. (2006). The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontol 2000*, **42**, 219-258. doi:10.1111/j.1600-0757.2006.00191.x
- Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*, **27**(6), 409-419. doi:10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x
- Hartzell, J. D., Torres, D., Kim, P., & Wortmann, G. (2005). Incidence of bacteremia after routine tooth brushing. *Am J Med Sci*, **329**(4), 178-180.
- Heitz-Mayfield, L. J., Schatzle, M., Loe, H., Burgin, W., Anerud, A., Boysen, H., & Lang, N. P. (2003). Clinical course of chronic periodontitis. II. Incidence, characteristics and time of occurrence of the initial periodontal lesion. *J Clin Periodontol*, **30**(10), 902-908.
- Heitz-Mayfield, L. J., Trombelli, L., Heitz, F., Needleman, I., & Moles, D. (2002). A systematic review of the effect of surgical debridement vs non-surgical debridement for the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, **29 Suppl 3**, 92-102; discussion 160-102.
- Herrera, D., Alonso, B., Leon, R., Roldan, S., & Sanz, M. (2008). Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol*, **35**(8 Suppl), 45-66. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01260.x
- Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., . . . Leon, R. (2008). Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol*, **35**(2), 106-113. doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01170.x
- Herrera, D., Matesanz, P., Bascones-Martinez, A., & Sanz, M. (2012). Local and systemic antimicrobial therapy in periodontics. *J Evid Based Dent Pract*, **12**(3 Suppl), 50-60. doi:10.1016/s1532-3382(12)70013-1

- Hersh, E. V., & Moore, P. A. (2008). Adverse drug interactions in dentistry. *Periodontol* 2000, **46**, 109-142. doi:10.1111/j.1600-0757.2008.00224.x
- Hirsch, R., Deng, H., & Laohachai, M. N. (2012). Azithromycin in periodontal treatment: more than an antibiotic. *J Periodontal Res*, **47**(2), 137-148. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01418.x
- Hirschfeld, L., & Wasserman, B. (1978). A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *J Periodontol*, **49**(5), 225-237. doi:10.1902/jop.1978.49.5.225
- Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T., & Maeda, N. (2009). Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res*, **88**(11), 982-990. doi:10.1177/0022034509346811
- Holub, B. J. (2002). Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *Cmaj*, **166**(5), 608-615.
- Hong, M. P., Kim, H. I., Shin, Y. K., Lee, C. S., Park, M., & Song, J. H. (2004). Effects of free fatty acids on sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res*, **1008**(1), 81-91. doi:10.1016/j.brainres.2004.02.033
- Huang, C. B., & Ebersole, J. L. (2010). A novel bioactivity of omega-3 polyunsaturated fatty acids and their ester derivatives. *Mol Oral Microbiol*, **25**(1), 75-80. doi:10.1111/j.2041-1014.2009.00553.x
- James, M. J., Gibson, R. A., & Cleland, L. G. (2000). Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr*, **71**(1 Suppl), 343s-348s. doi:10.1093/ajcn/71.1.343s
- Kassebaum, N. J., Bernabe, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C. J., & Marcenes, W. (2014). Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*, **93**(11), 1045-1053. doi:10.1177/0022034514552491
- Kesavalu, L., Bakthavatchalu, V., Rahman, M. M., Su, J., Raghu, B., Dawson, D., . . . Ebersole, J. L. (2007). Omega-3 fatty acid regulates inflammatory cytokine/mediator messenger RNA expression in *Porphyromonas gingivalis*-induced experimental periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*, **22**(4), 232-239. doi:10.1111/j.1399-302X.2007.00346.x
- Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., Blehert, D. S., Egland, P. G., Foster, J. S., & Palmer, R. J., Jr. (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol*

- Biol Rev*, **66**(3), 486-505, table of contents. doi:10.1128/mmbr.66.3.486-505.2002
- Kolenbrander, P. E., Ganeshkumar, N., Cassels, F. J., & Hughes, C. V. (1993). Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *Faseb j*, **7**(5), 406-413. doi:10.1096/fasebj.7.5.8462782
- Konig, J., Holtfreter, B., & Kocher, T. (2010). Periodontal health in Europe: future trends based on treatment needs and the provision of periodontal services--position paper 1. *Eur J Dent Educ*, **14 Suppl 1**, 4-24. doi:10.1111/j.1600-0579.2010.00620.x
- Kornman, K. S. (2008). Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol*, **79**(8 Suppl), 1560-1568. doi:10.1902/jop.2008.080213
- Kornman, K. S., & Robertson, P. B. (1985). Clinical and microbiological evaluation of therapy for juvenile periodontitis. *J Periodontol*, **56**(8), 443-446. doi:10.1902/jop.1985.56.8.443
- Krayer, J. W., Leite, R. S., & Kirkwood, K. L. (2010). Non-surgical chemotherapeutic treatment strategies for the management of periodontal diseases. *Dent Clin North Am*, **54**(1), 13-33. doi:10.1016/j.cden.2009.08.010
- Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., & Appel, L. J. (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, **106**(21), 2747-2757. doi:10.1161/01.cir.0000038493.65177.94
- Kruger, M. C., Coetzer, H., de Winter, R., Gericke, G., & van Papendorp, D. H. (1998). Calcium, gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid supplementation in senile osteoporosis. *Aging (Milano)*, **10**(5), 385-394.
- Lacey, R. W., & Lord, V. L. (1981). Sensitivity of staphylococci to fatty acids: novel inactivation of linolenic acid by serum. *J Med Microbiol*, **14**(1), 41-49. doi:10.1099/00222615-14-1-41
- Lane, N., Armitage, G. C., Loomer, P., Hsieh, S., Majumdar, S., Wang, H. Y., . . . Munoz, T. (2005). Bisphosphonate therapy improves the outcome of conventional periodontal treatment: results of a 12-month, randomized, placebo-controlled study. *J Periodontol*, **76**(7), 1113-1122. doi:10.1902/jop.2005.76.7.1113
- Lang, N. P., & Lindhe, J. (2015). *Clinical periodontology and implant dentistry, 2 Volume Set*: John Wiley & Sons.

- Laser, H. (1952). Adaptation of *Bacillus subtilis* to fatty acids. *Biochem J*, **51**(1), 57-62. doi:10.1042/bj0510057
- Lindhe, J., & Nyman, S. (1984). Long-term maintenance of patients treated for advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol*, **11**(8), 504-514.
- Listgarten, M. A. (1988). Bacterial invasion of periodontal tissues. *J Periodontol*, **59**(6), 412. doi:10.1902/jop.1988.59.6.412
- Liu, X., & Osawa, T. (2009). Astaxanthin protects neuronal cells against oxidative damage and is a potent candidate for brain food. *Forum Nutr*, **61**, 129-135. doi:10.1159/000212745
- Lo, C.-J., Chiu, K. C., Fu, M., Lo, R., & Helton, S. (1999). Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NFκB activity. *Journal of Surgical Research*, **82**(2), 216-221.
- Luostarinen, R., & Saldeen, T. (1996). Dietary fish oil decreases superoxide generation by human neutrophils: relation to cyclooxygenase pathway and lysosomal enzyme release. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **55**(3), 167-172.
- Magnusson, I., Lindhe, J., Yoneyama, T., & Liljenberg, B. (1984). Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *J Clin Periodontol*, **11**(3), 193-207.
- Mah, T. F., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, **9**(1), 34-39.
- Marik, P. E., & Varon, J. (2009). Omega-3 dietary supplements and the risk of cardiovascular events: a systematic review. *Clin Cardiol*, **32**(7), 365-372. doi:10.1002/clc.20604
- Marsh, P. D., Moter, A., & Devine, D. A. (2011). Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol 2000*, **55**(1), 16-35. doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00339.x
- Matesanz-Perez, P., Garcia-Gargallo, M., Figuero, E., Bascones-Martinez, A., Sanz, M., & Herrera, D. (2013). A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, **40**(3), 227-241. doi:10.1111/jcpe.12026
- Meydani, S. N., Endres, S., Woods, M. M., Goldin, B. R., Soo, C., Morrill-Labrode, A., . . . Gorbach, S. L. (1991). Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses

- cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *The Journal of nutrition*, **121**(4), 547-555.
- Meyle, J., & Chapple, I. (2015). Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*, **69**(1), 7-17. doi:10.1111/prd.12104
- Mil-Homens, D., Bernardes, N., & Fialho, A. M. (2012). The antibacterial properties of docosahexaenoic omega-3 fatty acid against the cystic fibrosis multiresistant pathogen *Burkholderia cenocepacia*. *FEMS Microbiol Lett*, **328**(1), 61-69. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02476.x
- Miles, E. A., & Calder, P. C. (2012). Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *Br J Nutr*, **107 Suppl 2**, S171-184. doi:10.1017/s0007114512001560
- Miller, R. D., Brown, K. E., & Morse, S. A. (1977). Inhibitory action of fatty acids on the growth of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*, **17**(2), 303-312.
- Mombelli, A., Gmur, R., Gobbi, C., & Lang, N. P. (1994a). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. I. Topographic distribution before and after treatment. *J Periodontol*, **65**(9), 820-826. doi:10.1902/jop.1994.65.9.820
- Mombelli, A., Gmur, R., Gobbi, C., & Lang, N. P. (1994b). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. II. Characterization of isolated strains and effect of mechanical periodontal treatment. *J Periodontol*, **65**(9), 827-834. doi:10.1902/jop.1994.65.9.827
- Mombelli, A., Schmid, B., Rutar, A., & Lang, N. P. (2000). Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol*, **71**(1), 14-21. doi:10.1902/jop.2000.71.1.14
- Montero, J., Yarte, J. M., Bravo, M., & Lopez-Valverde, A. (2011). Oral health-related quality of life of a consecutive sample of Spanish dental patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, **16**(6), e810-815. doi:10.4317/medoral.16790
- Muller, H. D., Eick, S., Moritz, A., Lussi, A., & Gruber, R. (2017). Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Oral Rinses In Vitro. *Biomed Res Int*, **2017**, 4019723. doi:10.1155/2017/4019723

- Narasimha Das, U. (2013). Lipoxins, resolvins, protectins, maresins and nitrolipids, and their clinical implications with specific reference to diabetes mellitus and other diseases: part II. *Clinical Lipidology*, **8**(4), 465-480.
- Novak, T. E., Babcock, T. A., Jho, D. H., Helton, W. S., & Espat, N. J. (2003). NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **284**(1), L84-89. doi:10.1152/ajplung.00077.2002
- Nussbaum, G., & Shapira, L. (2011). How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? *J Clin Periodontol*, **38 Suppl 11**, 49-59. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01678.x
- Page, R. C., & Kornman, K. S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, **14**, 9-11.
- Papapanou, P. N. (2002). Population studies of microbial ecology in periodontal health and disease. *Ann Periodontol*, **7**(1), 54-61. doi:10.1902/annals.2002.7.1.54
- Papapanou, P. N. (2012). The prevalence of periodontitis in the US: forget what you were told. *J Dent Res*, **91**(10), 907-908. doi:10.1177/0022034512458692
- Papapanou, P. N., Neiderud, A. M., Papadimitriou, A., Sandros, J., & Dahlen, G. (2000). "Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. *J Periodontol*, **71**(6), 885-897. doi:10.1902/jop.2000.71.6.885
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., . . . Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*, **89 Suppl 1**, S173-s182. doi:10.1002/jper.17-0721
- Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., . . . Dewhirst, F. E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*, **183**(12), 3770-3783. doi:10.1128/jb.183.12.3770-3783.2001
- Peng, Y., Zheng, Y., Zhang, Y., Zhao, J., Chang, F., Lu, T., . . . Li, N. (2012). Different effects of omega-3 fatty acids on the cell cycle in C2C12 myoblast proliferation. *Mol Cell Biochem*, **367**(1-2), 165-173. doi:10.1007/s11010-012-1329-4
- Petschow, B. W., Batema, R. P., & Ford, L. L. (1996). Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free fatty acids. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**(2), 302-306.

- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*, **366**(9499), 1809-1820. doi:10.1016/s0140-6736(05)67728-8
- Preshaw, P. M., & Taylor, J. J. (2011). How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol*, **38 Suppl 11**, 60-84. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01671.x
- Projan, S. J., & Youngman, P. J. (2002). Antimicrobials: new solutions badly needed. *Curr Opin Microbiol*, **5**(5), 463-465.
- Quirynen, M., & Van Assche, N. (2011). Microbial changes after full-mouth tooth extraction, followed by 2-stage implant placement. *J Clin Periodontol*, **38**(6), 581-589. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01728.x
- Raffaelli, L., Serini, S., Piccioni, E., Manicone, P. F., Berardi, D., Perfetti, G., & Calviello, G. (2008). N-3 polyunsaturated fatty acid effect in periodontal disease: state of art and possible mechanisms involved. *Int J Immunopathol Pharmacol*, **21**(2), 261-266. doi:10.1177/039463200802100202
- Rahman, M. M., Bhattacharya, A., & Fernandes, G. (2008). Docosahexaenoic acid is more potent inhibitor of osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells than eicosapentaenoic acid. *J Cell Physiol*, **214**(1), 201-209. doi:10.1002/jcp.21188
- Rams, T. E., Degener, J. E., & van Winkelhoff, A. J. (2014). Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota. *Clin Oral Implants Res*, **25**(1), 82-90. doi:10.1111/clr.12160
- Rams, T. E., & Slots, J. (1996). Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontol 2000*, **10**, 139-159.
- Reddy, M. S., Weatherford, T. W., 3rd, Smith, C. A., West, B. D., Jeffcoat, M. K., & Jacks, T. M. (1995). Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol*, **66**(3), 211-217. doi:10.1902/jop.1995.66.3.211
- Renvert, S., Wikstrom, M., Dahlen, G., Slots, J., & Egelberg, J. (1990). On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol*, **17**(6), 351-355.
- Richards, D. (2014). Review finds that severe periodontitis affects 11% of the world population. *Evid Based Dent*, **15**(3), 70-71. doi:10.1038/sj.ebd.6401037

- Rizzello, L., Sorce, B., Sabella, S., Vecchio, G., Galeone, A., Brunetti, V., . . . Pompa, P. P. (2011). Impact of nanoscale topography on genomics and proteomics of adherent bacteria. *ACS Nano*, **5**(3), 1865-1876. doi:10.1021/nn102692m
- Rocha, M., Nava, L. E., Vazquez de la Torre, C., Sanchez-Marin, F., Garay-Sevilla, M. E., & Malacara, J. M. (2001). Clinical and radiological improvement of periodontal disease in patients with type 2 diabetes mellitus treated with alendronate: a randomized, placebo-controlled trial. *J Periodontol*, **72**(2), 204-209. doi:10.1902/jop.2001.72.2.204
- Rodríguez, B. N., & Calvo, J. L. (2011). *Periodoncia en España, 2025: Estudio Delphi*: Sociedad Española de Periodoncia.
- Sachdeo, A., Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (2008). Biofilms in the edentulous oral cavity. *J Prosthodont*, **17**(5), 348-356. doi:10.1111/j.1532-849X.2008.00301.x
- Sanchez, M. C., Fernandez, E., Llama-Palacios, A., Figuero, E., Herrera, D., & Sanz, M. (2017). Response to antiseptic agents of periodontal pathogens in in vitro biofilms on titanium and zirconium surfaces. *Dent Mater*, **33**(4), 446-453. doi:10.1016/j.dental.2017.01.013
- Sanchez, M. C., Llama-Palacios, A., Blanc, V., Leon, R., Herrera, D., & Sanz, M. (2011). Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontal Res*, **46**(2), 252-260. doi:10.1111/j.1600-0765.2010.01341.x
- Sanchez, M. C., Llama-Palacios, A., Fernandez, E., Figuero, E., Marin, M. J., Leon, R., . . . Sanz, M. (2014). An in vitro biofilm model associated to dental implants: structural and quantitative analysis of in vitro biofilm formation on different dental implant surfaces. *Dent Mater*, **30**(10), 1161-1171. doi:10.1016/j.dental.2014.07.008
- Sanchez, M. C., Marin, M. J., Figuero, E., Llama-Palacios, A., Leon, R., Blanc, V., . . . Sanz, M. (2014). Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an in vitro subgingival biofilm model. *J Periodontal Res*, **49**(1), 20-28. doi:10.1111/jre.12073
- Sanlioglu, S., Williams, C. M., Samavati, L., Butler, N. S., Wang, G., McCray, P. B., Jr., . . . Engelhardt, J. F. (2001). Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factor-

- alpha secretion through IKK regulation of NF-kappa B. *J Biol Chem*, **276**(32), 30188-30198. doi:10.1074/jbc.M102061200
- Sanz, M., Beighton, D., Curtis, M. A., Cury, J. A., Dige, I., Dommisch, H., . . . Zaura, E. (2017). Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*, **44 Suppl 18**, S5-s11. doi:10.1111/jcpe.12682
- Sanz, M., & Chapple, I. L. (2010). First European Consensus Workshop in Periodontal Education--objectives and overall recommendation. *Eur J Dent Educ*, **14 Suppl 1**, 1. doi:10.1111/j.1600-0579.2010.00618.x
- Sanz, M., van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., Dellemijn-Kippuw, N., Simon, R., & Winkel, E. (2000). Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci*, **108**(5), 383-392.
- Saver, B. G., Hujoel, P. P., Cunha-Cruz, J., & Maupome, G. (2007). Are statins associated with decreased tooth loss in chronic periodontitis? *J Clin Periodontol*, **34**(3), 214-219. doi:10.1111/j.1600-051X.2006.01046.x
- Schatzle, M., Loe, H., Lang, N. P., Heitz-Mayfield, L. J., Burgin, W., Anerud, A., & Boysen, H. (2003). Clinical course of chronic periodontitis. III. Patterns, variations and risks of attachment loss. *J Clin Periodontol*, **30**(10), 909-918.
- Schiott, C. R., Loe, H., Jensen, S. B., Kilian, M., Davies, R. M., & Glavind, K. (1970). The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. *J Periodontal Res*, **5**(2), 84-89.
- Schutzhold, S., Kocher, T., Biffar, R., Hoffmann, T., Schmidt, C. O., Micheelis, W., . . . Holtfreter, B. (2015). Changes in prevalence of periodontitis in two German population-based studies. *J Clin Periodontol*, **42**(2), 121-130. doi:10.1111/jcpe.12352
- Sedlacek, M. J., & Walker, C. (2007). Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol*, **22**(5), 333-339. doi:10.1111/j.1399-302X.2007.00366.x

- Serhan, C. N. (2007). Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol*, **25**, 101-137. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141647
- Serrano, J., Escribano, M., Roldan, S., Martin, C., & Herrera, D. (2015). Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*, **42 Suppl 16**, S106-138. doi:10.1111/jcpe.12331
- Seymour, G. J., & Taylor, J. J. (2004). Shouts and whispers: An introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000*, **35**, 9-13. doi:10.1111/j.0906-6713.2004.003555.x
- Shaikh, S. R., Jolly, C. A., & Chapkin, R. S. (2012). n-3 Polyunsaturated fatty acids exert immunomodulatory effects on lymphocytes by targeting plasma membrane molecular organization. *Mol Aspects Med*, **33**(1), 46-54. doi:10.1016/j.mam.2011.10.002
- Sheu, C. W., & Freese, E. (1972). Effects of fatty acids on growth and envelope proteins of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **111**(2), 516-524.
- Silva, V., Barazzoni, R., & Singer, P. (2014). Biomarkers of fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids intake in humans. *Nutr Clin Pract*, **29**(1), 63-72. doi:10.1177/0884533613516144
- Simopoulos, A. P. (2011). Importance of the omega-6/omega-3 balance in health and disease: evolutionary aspects of diet. *World Rev Nutr Diet*, **102**, 10-21. doi:10.1159/000327785
- Singh, R. B., Niaz, M. A., Sharma, J. P., Kumar, R., Rastogi, V., & Moshiri, M. (1997). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival--4. *Cardiovasc Drugs Ther*, **11**(3), 485-491.
- Slots, J., & Rosling, B. G. (1983). Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J Clin Periodontol*, **10**(5), 465-486.
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*, **28**, 12-55.
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*, **38**, 135-187. doi:10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x

- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, **25**(2), 134-144.
- Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, **358**(9276), 135-138. doi:10.1016/s0140-6736(01)05321-1
- Sun, C. Q., O'Connor, C. J., & Robertson, A. M. (2003). Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **36**(1-2), 9-17. doi:10.1016/s0928-8244(03)00008-7
- Sun, D., Krishnan, A., Zaman, K., Lawrence, R., Bhattacharya, A., & Fernandes, G. (2003). Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res*, **18**(7), 1206-1216. doi:10.1359/jbmr.2003.18.7.1206
- Sun, M., Zhou, Z., Dong, J., Zhang, J., Xia, Y., & Shu, R. (2016). Antibacterial and antibiofilm activities of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) against periodontopathic bacteria. *Microb Pathog*, **99**, 196-203. doi:10.1016/j.micpath.2016.08.025
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., & Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*, **17 Suppl 2**, 68-81. doi:10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x
- Tonetti, M. S., Jepsen, S., Jin, L., & Otomo-Corgel, J. (2017). Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *J Clin Periodontol*, **44**(5), 456-462. doi:10.1111/jcpe.12732
- van der Weijden, G. A., & Hioe, K. P. (2005). A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J Clin Periodontol*, **32 Suppl 6**, 214-228. doi:10.1111/j.1600-051X.2005.00795.x
- Van der Weijden, G. A., & Timmerman, M. F. (2002). A systematic review on the clinical efficacy of subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, **29 Suppl 3**, 55-71; discussion 90-51.
- Van Dyke, T. E. (2007). Control of inflammation and periodontitis. *Periodontology 2000*, **45**(1), 158-166.
- Van Strydonck, D. A., Slot, D. E., Van der Velden, U., & Van der Weijden, F. (2012). Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and

- staining in gingivitis patients: a systematic review. *J Clin Periodontol*, **39**(11), 1042-1055. doi:10.1111/j.1600-051X.2012.01883.x
- van Winkelhoff, A. J. (2012). Antibiotics in the treatment of peri-implantitis. *Eur J Oral Implantol*, **5 Suppl**, S43-50.
- van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., Oteo, A., & Sanz, M. (2005). Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol*, **32**(8), 893-898. doi:10.1111/j.1600-051X.2005.00782.x
- Vedin, I., Cederholm, T., Freund Levi, Y., Basun, H., Garlind, A., Faxen Irving, G., . . . Palmblad, J. (2008). Effects of docosahexaenoic acid-rich n-3 fatty acid supplementation on cytokine release from blood mononuclear leukocytes: the OmegAD study. *Am J Clin Nutr*, **87**(6), 1616-1622. doi:10.1093/ajcn/87.6.1616
- Vreugdenhil, M., Bruehl, C., Voskuyl, R. A., Kang, J. X., Leaf, A., & Wadman, W. J. (1996). Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(22), 12559-12563. doi:10.1073/pnas.93.22.12559
- Whittaker, C. J., Klier, C. M., & Kolenbrander, P. E. (1996). Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **50**, 513-552. doi:10.1146/annurev.micro.50.1.513
- Wieckowski, M. R., & Wojtczak, L. (1998). Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett*, **423**(3), 339-342. doi:10.1016/s0014-5793(98)00118-5
- Yates, C. M., Calder, P. C., & Ed Rainger, G. (2014). Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacol Ther*, **141**(3), 272-282. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.10.010
- Yen, C. A., Damoulis, P. D., Stark, P. C., Hibberd, P. L., Singh, M., & Papas, A. S. (2008). The effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor (celecoxib) on chronic periodontitis. *Journal of periodontology*, **79**(1), 104-113.
- Zhou, Y., Guan, X., Zhu, W., Liu, Z., Wang, X., Yu, H., & Wang, H. (2014). Capsaicin inhibits *Porphyromonas gingivalis* growth, biofilm formation, gingivomucosal inflammatory cytokine secretion, and in vitro osteoclastogenesis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **33**(2), 211-219. doi:10.1007/s10096-013-1947-0

